Über ein neues Flavon aus dem Rosmarinblatt

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Hermann Sprißler

aus Sigmaringen

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0099

Über ein neues Flavon aus dem Rosmarinblatt

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hermann Sprißler
aus Sigmaringen

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.1968

Dekan: Professor Dr. H. Blume

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Graf
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meinem Vater zum Gedenken,
meiner Mutter und meiner Frau
in Dankbarkeit

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. Engelbert GRAF,
danke ich sehr herzlich für die Überlassung
der Arbeit, für die zahlreichen Anregungen
und die mir erwiesene großzügige Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Harry AUTERHOFF
danke ich herzlich für die wohlwollende
Förderung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Problemstellung	1
Isolierung der Flavonoide	1
Trennung der Flavonoide	4
Eigenschaften von Substanz D	8
I. Gruppenbestimmung durch Farbreaktionen	10
a.) Vergleich gebildeter Reduktionsfarben	10
b.) Vergleich verschiedener Farbreaktionen	12
c.) Reaktionen mit Rhodamin B	14
d.) Zirkon-Citronensäure-Test	14
II. Aglykon D	16
Methylierung von Aglykon D	16
Molekulargewichtsbestimmungen	18
III. Substanz E	19
IV. UV-Spektroskopie	20
a.) UV-Spektren in neutraler Lösung	20
b.) UV-Spektren in Natriumacetat-Borsäure-Lösung	24
c.) UV-Spektren in Natriumäthylatlösung	27
d.) UV-Spektren der Aluminiumchelatkomplexe	31
e.) Spektralverschiebung mit Natrium-Acetat	35
V. Massenspektren	42
VI. NMR-Spektroskopie	48
Zusammenfassung	53
Beschreibung der Versuche	55

PROBLEMSTELLUNG

E. Graf und W. Hoppe stellten gelegentlich ihrer Untersuchung über die Inhaltsstoffe des Rosmarinweines fest, daß im alkoholischen Auszug der Rosmarinblätter eine Reihe phenolischer Substanzen enthalten ist, bei denen es sich zum Teil um Flavonoide handelt. Erste Versuche zur Isolierung dieser Stoffe wurden von ihnen bereits unternommen.
Aufgabe dieser Arbeit war es, die Flavonoide zu isolieren, ihre Trennung zu versuchen und möglichst ihre Struktur aufzuklären.

Isolierung der Flavone

Die klassische Methode der erschöpfenden Warmextraktion nach Soxhlet mit Lösungsmitteln steigender Polarität - wie Petroläther, Äther, Chloroform, Essigester, Äthanol (90 %) - führte zu einer Anreicherung von Flavonoiden im Essigester- und Äthanol-Anteil; aus der Ätherfraktion wurden 0,5 % Ursolsäure isoliert. Die weitere Auftrennung der Flavonoide war schwierig.

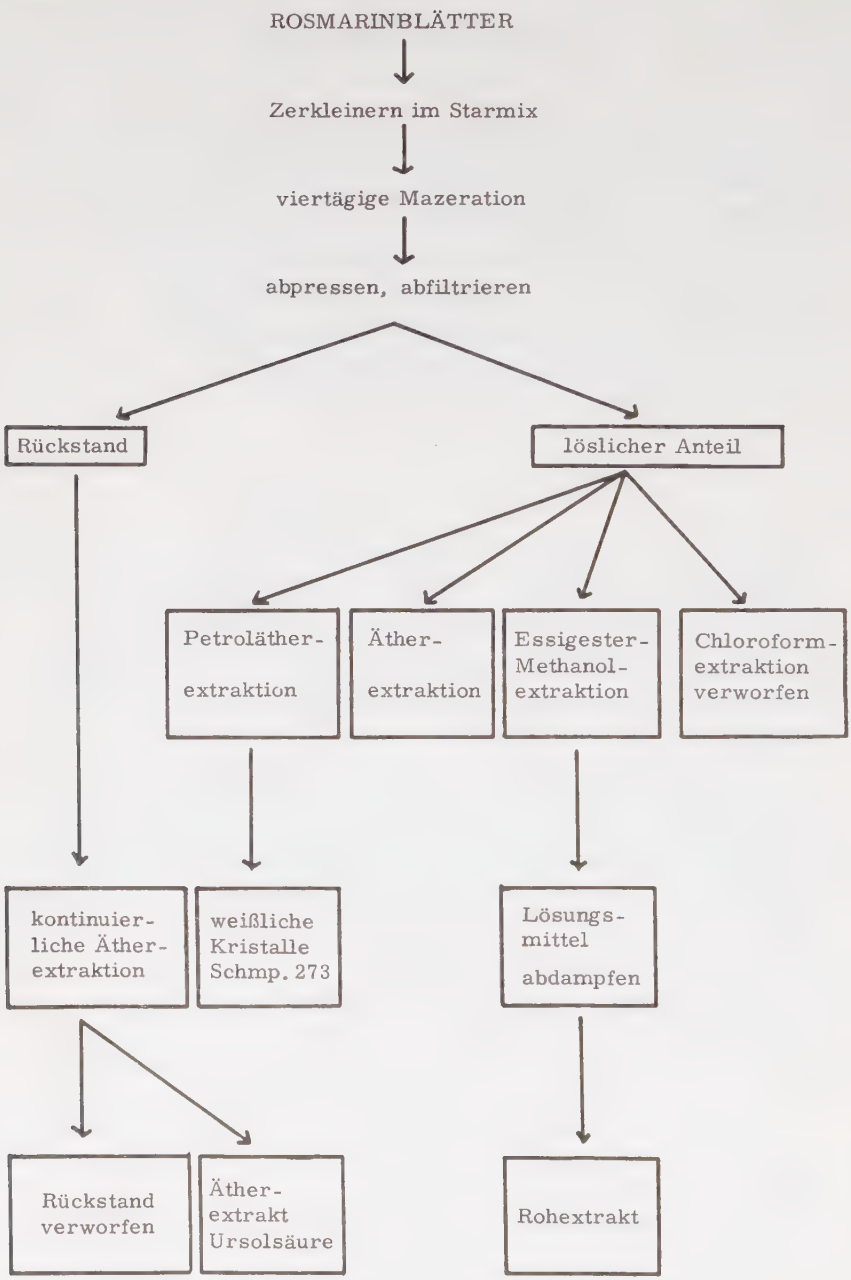
Erfolgreicher war die Extraktion nach der von Graf und Hoppe beschriebenen Methode.[1] Um einer fermentativen Zerlegung der in dem getrockneten Material enthaltenen Glykoside vorzubeugen, wurde das zerkleinerte Ausgangsmaterial zwei Stunden lang mit 90 proz. Äthanol unter Rückfluß erhitzt.

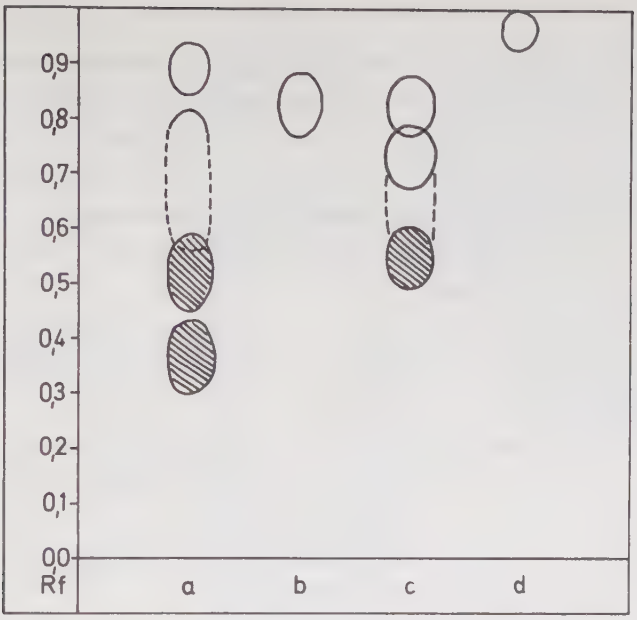
Nachfolgende Abbild. 1 zeigt den Aufarbeitungsgang.

---

1) W. Hoppe, Diss. Tübingen (1964)

Abb. 1: Aufarbeitungsgang





a.) alkoholisches Mazerat
b.) Ätherausschüttelung
c.) Essigesterausschüttelung
d.) Chloroformausschüttelung

Abb. 2: Schematisches Papierchromatogramm der Extrakte mit n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) als Fließmittel (absteigende Methode).

Rf-Bereich	unbehandelt TL	unbehandelt UV	Aluminiumchlorid TL	Aluminiumchlorid UV
0,30-0,43	-	violett	-	-
0,44-0,59	-	kräftig violett	gelb	grün
0,56-0,80	-	blau	schwach gelb	schwach grün
0,82-0,96	-	bl.Fl.	blau-grau	starke bl.Fl.

Tab. 1: Reaktion der einzelnen Chromatogrammflecke mit 2 proz. äthanol. Aluminiumchloridlösung

Trennung der Flavonoide

Die Versuche zur präparativen säulenchromatographischen Trennung auf Cellulosepulver (Ederol 221) mit wassergesättigtem Essigester oder mit Essigester/Ameisensäure/Wasser (10:2:3) brachten keine guten Resultate. Alle Fraktionen enthielten die bei den pc. Vorversuchen schon beobachteten blau fluoreszierenden Begleitstoffe. Begleitstoffe verhinderten offenbar auch das Auskristallisieren der Flavonoide sowie die Trennung derselben durch Craig-Verteilung.

Säulenchromatographie an Al_2O_3 oder SiO_2 verbot sich mangels Eluierbarkeit der Substanzen, die einerseits zur Chelatbildung, andererseits zur Verharzung neigen.

Die bereits von Grassmann[1], Neu[2], Hänsel[3] und Hörhammer[4] zur Flavonoidtrennung eingesetzte Säulenchromatographie an Polyamid erwies sich auch hier als gangbar. Aus methanolischer Lösung adsorbiert das Polyamid die Begleitstoffe (Harze und Gerbstoffe) recht fest; die Qualität der Trennung des Flavonoidgemischs war unterschiedlich:

1. Perlonpulver feinst DIN 30 der Farbwerke Hoechst AG. gab die besten Resultate; das Flavonoidgemisch wurde gut getrennt und konnte fast quantitativ eluiert werden, während die Begleitstoffe fest hafteten. Leider war dieses Perlonpulver aber nicht wiederzubekommen, da die Herstellerfirma die Produktion eingestellt hatte.
2. Polyamid zur Säulenchromatographie WOELM erlaubte nur eine unvollständige Desorption.
3. Ultramid K 228 BM 2 der BASF ergab zwar weniger scharf abgesetzte Trennzonen, aber es konnten damit angereicherte Fraktionen erhalten werden, die einem erneuten Trennprozeß auf Polyamid unterworfen wurden. Danach waren die isolierten Flavonoide papierchromatographisch rein. Das Säulenmaterial mußte aber vor Gebrauch mit sehr viel Methanol gewaschen werden (20 l).

---

1) W. Grassmann, H. Endres, W. Pauckner und H. Mathes, Chem. Ber. 90, 1125 (1957)
2) R. Neu, Nature (London) 182, 660 (1958)
3) R. Hänsel und J. Klaffenbach, Arch. Pharmaz. 294/66, 158 (1961)
4) L. Hörhammer, H. Wagner und W. Leeb, Naturwissenschaften 44, 513 (1957)

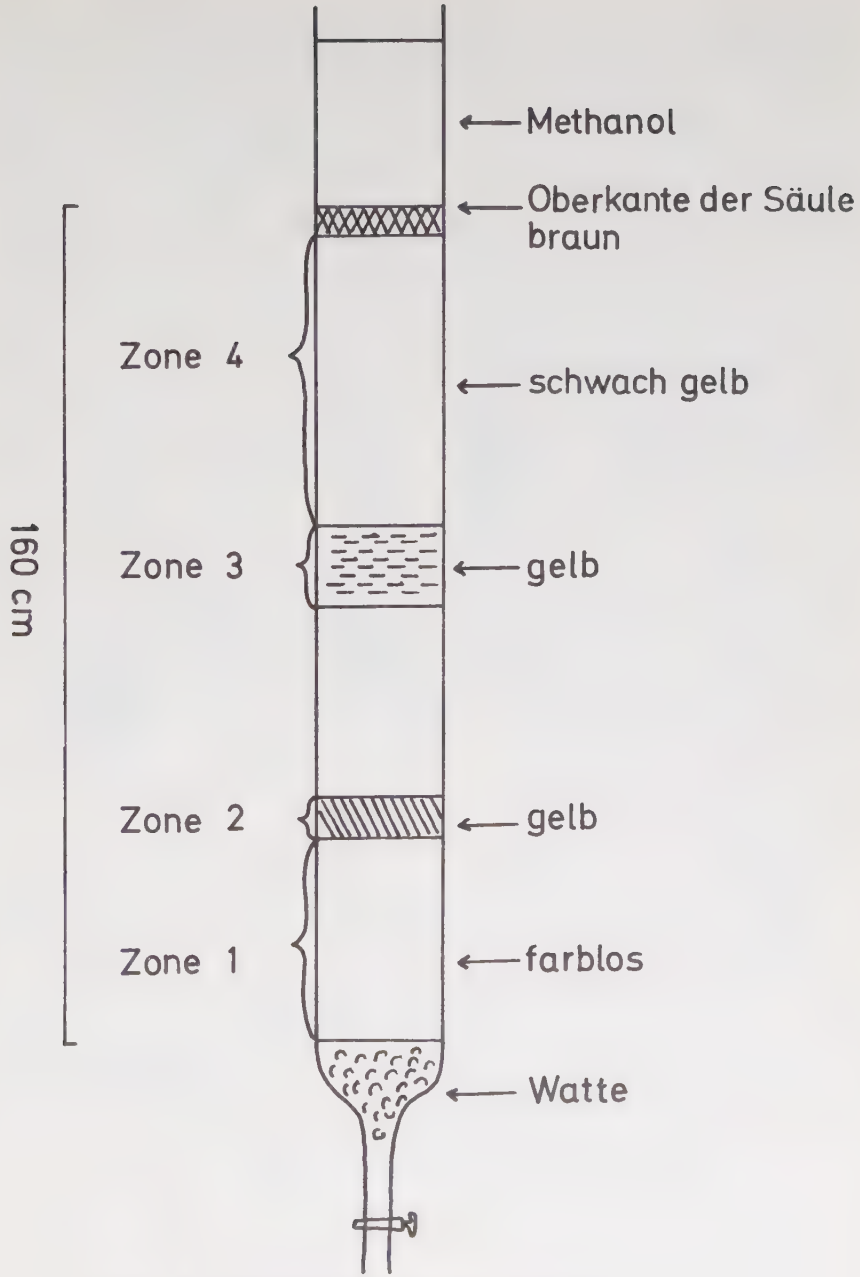


Abb. 3 Säulenchromatogramm

75 Fraktionen von der Säule wurden eluiert und pc kontrolliert.

In Abb. 4 entsprechen:

Zone der Polyamidsäule	Startfleck des Papierchromatogramms
1	a
2	b
3	c + d
4	e

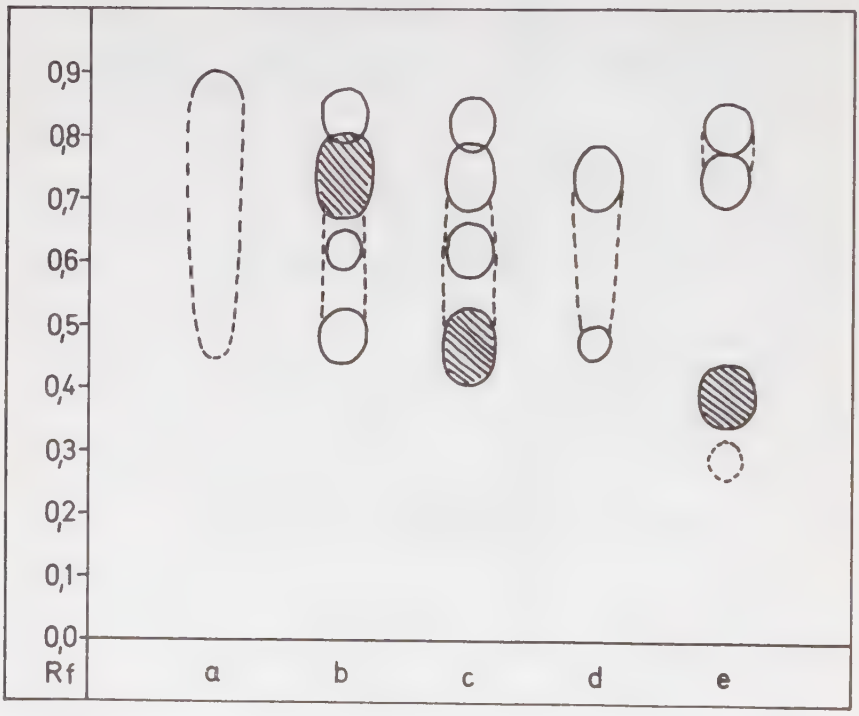


Abb. 4: a) Fraktions-Nr. 1-13
b) Fraktions-Nr. 14-26
c) Fraktions-Nr. 27-42
d) Fraktions-Nr. 43-60
e) Fraktions-Nr. 63-75

Schematisches PC der Polyamidfraktionen

Substanz	Rf-Wert	unbehandelt		Aluminiumchl. 2 % äthanol.		Bleiacetat 1 % wässr.		Ammoniak 25 %	
		TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV
A	0,82	braun	blau	grau-blau	grün	braun	grün	braun	gelb-grün
B	0,73	-	viol.	gelb	grün	gelb	grün	gelb	grün
C	0,62	-	blau	-	blau	-	braun	-	blau
D	0,53	-	viol.	gelb	grün	gelb	grün	gelb	grün
E	0,48	-	viol.	gelb	grün	gelb	grün	gelb	grün
F	0,39	-	braun	gelb	gelb	gelb	braun	gelb	gelb

Tab. 2: Rf-Werte und einige Farbreaktionen der isolierten Subst.

Die angegebenen Rf-Werte sind nicht identisch mit denen der Reinsubstanzen. Begleitstoffe haben hier beträchtlichen Einfluß. Die Reproduzierbarkeit ist ebenfalls nicht gut. Die Substanz (Rf 0,53) tritt nur in denjenigen Fraktionen auf, die unter Ausschluß der Fermentwirkung gewonnen wurden. An ihrer Stelle erscheint in den fermenthaltigen Extrakten der Fleck E (Rf 0,48).

Beim Einengen der Fraktionen 27-42 fiel Substanz E, noch mit Begleitstoffen verunreinigt, in einer Menge von 130 mg aus, die rechromatographiert wurden. Auf diese Weise wurden aus einem kg Blattdroge durchschnittlich 220 mg pc reine Substanz E gewonnen

Analog wurde Substanz D in gleicher Menge gewonnen, desgleichen aus den Fraktionen 63-75 in erheblich geringerer Menge Substanz F.

Eigenschaften von Substanz D

Feines gelbes Kristallpulver

unlöslich in Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Äther und Aceton

löslich in Methanol, Äthanol, Isopropanol und heißem Wasser

leicht löslich in: Laugen und Dimethylformamid unter Gelbfärbung.

Schmelzpunkt

260 - 265°

Reaktionen

Eisen-(III)-chloridlösung färbt eine alkoholische Lösung des Glykosids olivgrün. In konzentrierter Schwefelsäure löst sich die Substanz unter Gelbfärbung. Die Glykosidnatur wurde aus der Reduktion von Fehlingscher Lösung erkannt. Mit wäßriger Natronlauge entstand Gelbfärbung.

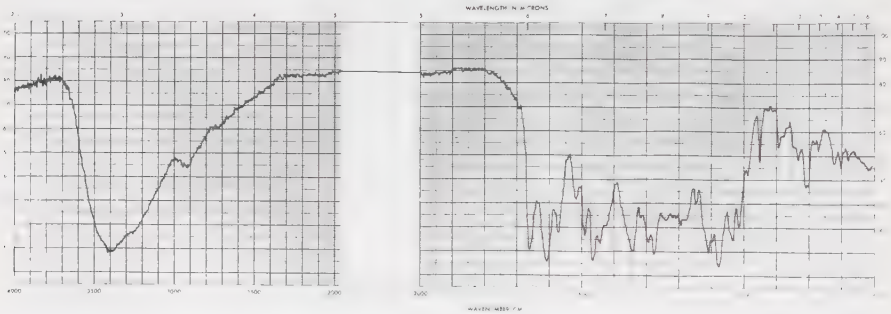


Abb. 5: IR-Spektrum von Glykosid D in KBr

Hydrolyse von Glykosid D

Die saure Hydrolyse mit 0,5 n HCl ergab das Aglykon D und ein Zuckergemisch. Das Aglykon D löste sich im Gegensatz zum Glykosid gut in Methanol und schmolz bei 263°. Quantitative Hydrolysen ergaben zwischen 45,5 und 46 % Aglykon. Der Zuckergehalt betrug also ca. 55 %, was auf das Vorliegen eines Disaccharids hindeutete. Nach der Hydrolyse wurde die neutralisierte Zuckerlösung papierchromatographiert.

Es traten Flecke mit den Rf-Werten von Glucose und Rhamnose auf, was aber nicht eindeutig ist.

Beispielsweise bereitet es Schwierigkeiten, Glucose und Galactose pc voneinander zu unterscheiden. Zudem geben beide gleiche Farb- und Fluoreszenz-Reaktionen. Deshalb wurde das Zuckergemisch auch gaschromatographisch untersucht. Dazu wurde das Glykosid D nach der Methode von L. Hörhammer, R. Hänsel und Mitarbeiter[1] mit 2 proz. Schwefelsäure hydrolysiert und die Lösung mittels Anionenaustauschers Dowex II entsäuert. Nach Hochvakuumtrocknung wurde der Rückstand nach C.C. Sweeley und Mitarbeiter[2] trimethylsilyliert und gaschromatographiert.

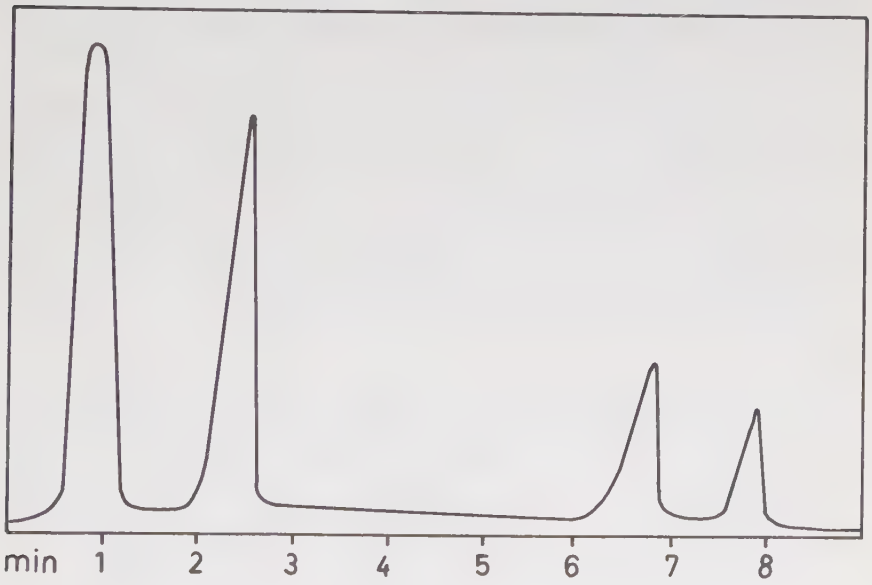


Abb. 6: Gaschromatogramm der Zucker von Glykosid D

Zum Vergleich wurde eine Mischung authentischer Rhamnose und Glucose ebenso behandelt. Die Anzahl und die Retentionszeiten der Peaks waren in beiden Chromatogrammen dieselben.

1) L. Hörhammer, R. Hänsel, G. Grießmaier und L. Endres, Arch. Pharmaz. 286/60, 423 (1955)
2) C.C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita und W.W. Wells, J.Amer. Chem. Soc. 85, 2497 (1963)

I. GRUPPENBESTIMMUNG DURCH FARBREAKTIONEN

a.) Vergleich gebildeter Reduktionsfarben

Anthoxanthine, die den γ-Pyronring enthalten, geben bei der Reduktion mit metallischem Magnesium in saurem Medium mit zunehmender Anzahl an Hydroxyl- oder Methoxyl-gruppen gelbe bis orange bis rotviolette Verbindungen. Die verschiedenartige Färbung beruht nach J. Shinoda[1] auf der Art der Seitenphenylsubstitution. Ersetzt man nach J.C. Pew[2] im Shinoda-Test Magnesium durch Zink, so sind weitere Unterscheidungen möglich.

M. Shimizu[3] hat vergleichende Farbreaktionen nach Shinoda und Pew anhand einer Anzahl von Flavonoiden einander gegenübergestellt.
Bei der Durchsicht dieser Tabellen fällt auf, daß sich die Farbe bei Flavonen, Flavonolen, Flavonol-3-glykosiden und Flavonol-3-methoxy-derivaten mit zunehmender Substitution von farblos über gelb-orange-fleischfarben-rot nach violett-rot ändert. Dabei scheint auch das Substitutionsmuster, d.h. die Verteilung der Substituenten am Molekül, einen Einfluß zu haben. Eine Farbvertiefung scheint besonders bei 4'-substituierten Flavonolen einzutreten:

	Shinoda	Pew
Flavanone	rotviolett	fleischfarben
Flavanonole	rotviolett	rotviolett
Flavonole	gelb-rotviol.	farblos-fleischf.
Flavonol-3-glykoside	gelb-rotviol.	farblos-rot
Flavonol-3-methoxy-derivate	gelb-rotviol.	farblos-rotviol.
Flavone	gelb-orangerot	gelb-rotviol.
Glykosid D	orange	rotviolett
Aglykon D	orange	rotviolett

Tab. 3: Reaktionsfarben von Flavonoiden beim Shinoda- und Pew-Test

1) J. Shinoda, J.Pharm.Soc.Japan 48, 35 (1928)
2) J.C. Pew, J.Amer.Chem.Soc. 70, 3031 (1948)
3) M. Shimizu, J.Pharm.Soc.Japan 72, 338 (1952)

Aufgrund der Reduktionsfarben könnte es sich beim Flavon D um ein Flavonol-3-methoxy- oder um ein Flavonderivat handeln. Die Flavanon- oder Flavanonol-gruppe wäre auszuschließen.
Aus den Tabellen von Shimizu ist außerdem zu entnehmen, daß beim Shinoda-test die charakteristische rote oder rotviolette Anthocyanfarbe immer dann entfällt, wenn das Seitenphenyl keinen sauerstoffhaltigen Substituenten besitzt. In solchen Fällen entsteht nur eine schwach gelbe bis schwach orange Farbe.

Shinoda hat die Beweiskraft seines Tests insofern selbst eingeschränkt, als er feststellte, daß unsubstituierte Flavone keine eindeutige Reduktionsfarbe ausbildeten.

In den meisten Veröffentlichungen über Flavonoidstrukturaufklärungen wird der Shinodatest als sicher behandelt und entsprechend bewertet. L. Hörhammer und H. Müller[1] erweiterten den Shinodatest und erwähnten besonders den Farbumschlag der Reduktionsprodukte von Flavonen von rötlich nach blau oder violett beim Alkalisieren mit Natriumacetat und die Ausbildung ebenso gefärbter Eisenkomplexsalze. Solche Farbänderungen traten bei Flavonen mit einer C-4'-Substitution auf. Sie sollen nach Hörhammer[2] auf einer Umlagerung der Carboniumform mit benzoidem in die Phenolatform mit chinoidem Seitenphenyl beruhen. Die Farbtiefe ist auch hier abhängig von der Anzahl auxochromer Hydroxylgruppen.

Substanz D bildete bei diesen Reaktionen blaue Färbungen aus, so daß im Seitenphenyl mindestens ein sauerstoffgebundener Substituent anzunehmen ist.

---

1) L. Hörhammer und H. Müller Arch. Pharmaz. 287/59, 377 (1954)
2) L. Hörhammer und R. Hänsel Arch. Pharmaz. 287/59, 36 (1954)

b.) Vergleich verschiedener Farbreaktionen

Will man Farbreaktionen zur Strukturzuordnung eines Flavons verwenden, so muß man möglichst zahlreiche der angegebenen Reaktionen ausführen.

Reaktion	Flavanon	Flavanonol	Flavonol	Flavon	Glykosid D
1	-	hellgelb	gelb	-	-
2	braun	gelbgrün	gelbgrün	rotviol.	rotviolett
3	orange	orange	orange	gelb	gelb
4	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
5	braungelb	-	braungelb	gelb	gelb
6	gelb	gelbgrün	gelb	gelbbraun	gelbbraun
7	-	-	gelb	-	-
8	gelb	gelb	gelb	-	-
9	hellgelb	hellgelb	gelb	gelb	gelb
10	-	gelb	gelb	-	gelb
11	gelb	grün	gelb	-	gelb
12	rosa	rosa	gelb	rosa	rosa
13	violett	gelb	gelb	gelb	schw.gelb
14	-	-	gelb	-	-
15	gelb	grün	gelb	-	-

Tab. 4: Farbreaktionen verschiedener Flavonoidgruppen

Glykosid D zeigt weitgehende Übereinstimmung mit den für Flavone angeführten Reaktionen. Die gleichen Reaktionen wurden mit Aglykon D ausgeführt und dabei dieselben Ergebnisse erhalten.

Es kann nach dieser Untersuchung als wahrscheinlich gelten, daß Substanz D ein Flavonderivat ist.

Reaktionen:

1) PC im Tageslicht[1,2]

2) PC im UV-Licht[1,2]

3) PC mit Ammoniak bedampft im Tageslicht[1,2]

4) PC mit Ammoniak bedampft im UV-Licht[1,2]

5) PC mit 10proz. wäßriger KOH besprüht und bei 105° getrocknet, im Tageslicht[2]

6) PC wie bei 5 behandelt, im UV-Licht[2]

7) PC mit 4proz. Salzsäure besprüht, im Tageslicht[3]

8) PC mit 1proz. Vanillinlösung in 25proz. Salzsäure besprüht, im Tageslicht[1,4,5]

9) Eine Lösung von Flavon in konz. Schwefelsäure gelöst, im TL[6,7]

10) PC mit einer 1proz. äthanol. Aluminiumchloridlösung besprüht, im TL[1,2,5]

11) PC mit einer 1proz. Aluminiumchloridlösung besprüht, im UV-Licht[1]

12) PC mit einer 0,5proz. Echtblau-B-lösung besprüht, im TL[7]

13) PC mit einer frisch bereiteten 2proz. methanol. Natriumborhydridlösung, noch während sie sprudelt besprüht, drei Min. an der Luft getrocknet, mit Salzsäurenebeln bedampft, im TL[1,8]

14) PC mit einer 0,5 proz. methanol. Magnesiumacetatlösung besprüht, im TL[2,5]

15) PC mit einer 0,5proz. methanol. Magnesiumacetatlösung besprüht, im UV-Licht[5]

---

1) M.K. Seikel in T.A. Geissman: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press (London) 1962 S.51
2) J.M. Hais und K. Macek: Handbuch der Papierchromatographie Verlag Gustav Fischer Jena 1958 S.311-341
3) J.M. Hais und K. Macek: Handbuch der Papierchromatographie Verlag Gustav Fischer Jena 1958 S.735
4) K. Freudenberg und K. Weinges in T.A. Geissman: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press (London) 1962 S.201
5) J.M. Hais und K. Macek: Handbuch der Papierchromatographie Verlag Gustav Fischer Jena 1958 S.745
6) K. Venkataraman in T.A. Geissman: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press (London) 1962 S.72
7) R. Neu, Z. analyt. Chem. 151, 321-328 (1956)
8) L. Horowitz, J. org. Chem. 22, 1733-35 (1957)

c.) Reaktionen mit Rhodamin B

Rhodamin B stellt nach R. Neu[1] ein spezifisches Reagens zum Nachweis von Flavanonen und Flavanonolen im Papierchromatogramm und im Reagenzglas dar. Beim Besprühen der markierten Flecke mit einer 0,1 proz. Reagenzlösung entstehen bei Flavanonen oder Flavanonolen violette Tönungen, während Flavone und Flavonole dabei nicht reagieren sollen. Wird der Substanzfleck zusätzlich mit Ammoniak behandelt, dann treten Flavone und Flavonole als orange Flecke hervor; Flavanone bzw. Flavanonole reagieren nicht.

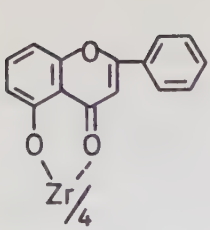
Papierchromatographierte Substanz D verhielt sich dabei wie ein Flavon oder Flavonol, im Gegensatz dazu zeigte sie aber im Reagenzglas die Reaktionen eines Flavanons oder Flavanonols, nämlich Auslöschung der hellroten Fluoreszenzfarbe im UV-Licht. Auch in der Arbeit von R. Neu selbst weichen einige Beispiele von der Regel ab. A. Curzte und W. Holland[2] haben aufgrund umfangreicher Untersuchungen auf die Unzuverlässigkeit dieser Regel hingewiesen.
Eindeutige Aussagen lassen sich mit dem

d.) Zirkon-Citronensäure-Test

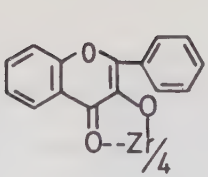
machen. Flavonoide, die eine Carbonylgruppe in Nachbarschaft einer Hydroxylgruppe oder zwei orthoständige phenolische Hydroxylgruppen enthalten, geben farbige Metalllkomplexe, diejenigen mit Zirkon-IV sind selbst in Gegenwart starker Mineralsäuren beständig. Auf der Basis dieser Beobachtungen entwickelten L. Hörhammer, R. Hänsel und Mitarb.[3] einen Test zur Unterscheidung zwischen mehreren Strukturen. Oxyflavone geben in alkoholischer Lösung mit Zirkon-IV-salzen Chelate folgender Strukturen:

---

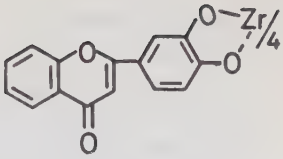
1) R. Neu, Arch. Pharmaz. 292/64, 433 (1959)
2) A. Curzte und W. Holland, Dtsch. Apotheker-Zeitung 107/5, 147 (1967)
3) L. Hörhammer, R. Hänsel und Mitarbeiter, Arch. Pharmaz. 284/56, 276 (1951), ebenda 285/57, 438 (1952), ebenda 286/58, 425 (1953), ebenda 287/59, 310 (1954)



1



2



3

Da bei diesen Reaktionen Wasserstoffionen frei werden, muß überschüssige Mineralsäure das Gleichgewicht nach der Seite der Ausgangskomponenten hin verschieben, und die gelbe Komplexfarbe muß immer mehr verblassen. Sofort aber verschwindet die Farbe, wenn der Lösung eine ebenfalls zur Komplexbildung fähige Säure hinzugefügt wird, z.B. Oxal- oder Citronensäure. Nach Hörhammer und Mitarbeitern kann man mittels Citronensäure deutlich zwischen sechsgliedrigen (1) und fünfgliedrigen (2 und 3) Komplexen unterscheiden: Sechsgliedrige sind in Gegenwart von Citronensäure so gut wie nicht existenzfähig, die gelbe Farbe verschwindet; fünfgliedrige Chelate bleiben jedoch bestehen.

Glykosid D verhielt sich hier gemäß (1). Demnach wäre Glykosid D entweder ein Flavon oder ein Flavonol-3-glykosid oder ein Flavonol-3methyläther, jeweils mit freier C-5-Hydroxylgruppe. Eine Unterscheidung zwischen diesen drei Möglichkeiten konnte dadurch noch nicht getroffen werden. Nachdem aber der Zirkon-Citronensäuretest auch bei Aglykon D negativ verlief, konnte es als erwiesen gelten, daß die Zucker nicht am C-3-Atom gebunden waren, denn sonst hätte sich nach (2) ein beständiger fünfgliedriger Ring ausbilden müssen.

Eine Brenzkatechingruppierung im Seitenphenyl ermöglicht nach (3) ebenfalls die Ausbildung eines beständigen fünfgliederigen Chelatkomplexes. Deshalb wurde mit dem partiell methylierten Aglykon D der Test wiederholt. Erst jetzt wurde nach Citronensäurezugabe die Reagenzlösung völlig farblos. Ein partiell methyliertes Produkt läßt sich mit Diazomethan leicht herstellen, da das C-5-Hydroxyl nicht mitreagiert.

Glykosid D ist nach diesen Untersuchungen mit großer Wahrscheinlichkeit ein Flavon oder ein Flavonol-3-methyläther mit freiem Hydroxyl an C-5.

II. AGLYKON D

Methylierung von Aglykon D

Die Methylierung von Aglykon D mit Dimethylsulfat[1] in alkalischer Lösung führte nur zu einer braunen, zähflüssigen Masse, aus der keine Kristalle zu gewinnen waren. Mit Diazomethan wurden nach Abdunstenlassen des Reagens-Überschusses und nach 24 std. Stehen im Eisschrank weißliche Kristalle erhalten, die nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol einen Schmelzpunkt von 180-181° hatten.

---

1) L. Hörhammer, H.J. Gehrmann und L. Endres, Arch. Pharmaz. 292/64, 121 (1959)

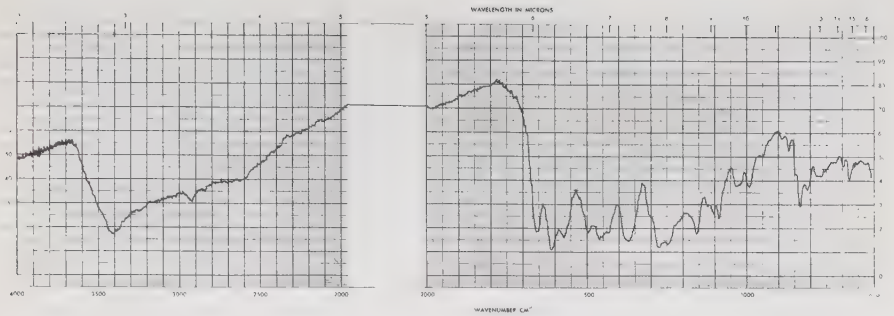


Abb. 7: IR-Spektrum von Aglykon D in KBr

Charakter. Banden: 3390 (Hydroxylgruppen) 2900 (CH-Gruppen)
1657 (CO-Bande von Flavonen mit freiem C-5-Hydroxyl)[1)]
1610 (konjugierte C=C-Gruppe)
1340, 1270, 1185, (aromatische Hydroxyle)
1030 (Methoxylgruppe)
790, 850, 810 (Dihydroxygruppe des Seitenphenyls)[2)]

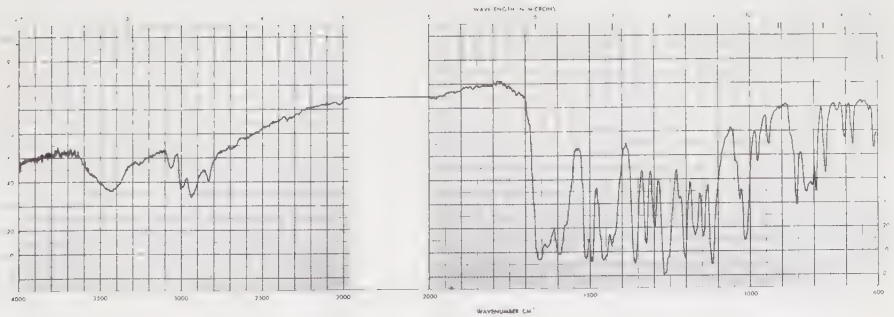


Abb. 8: IR-Spektrum des methylierten Aglykons D in KBr

1) L. Hörhammer, H. Wagner und F. Gloggengießer, Arch. Pharmaz. 291/63, 129 (1958)
2) H. Dannenberg, U. Schiedt und W. Steidle, Z. Naturforsch. 86, 269 (1953)

Molekulargewichtsbestimmungen

Die Molekulargewichte von Aglykon D und methyliertem Aglykon D wurden massenspektrometrisch bestimmt (Perfluortributylamin als Vergleichssubstanz). Der Molekülpeak von Aglykon D zeigte das Molekulargewicht 316, der des methylierten Aglykon D 358. Die Bestimmung nach Zeisel ergab für das Aglykon D 8,2 % OCH_3, entsprechend einer Methoxylgruppe pro Molekül. Für das methylierte Aglykon D wurden 31,5 % OCH_3 gefunden, entsprechend vier Methoxylgruppen. Da das methylierte Aglykon D mit Zirkonoxychlorid einen unbeständigen Chelatkomplex bildete, und da mit Eisen-III-chlorid Grünfärbung auftrat, kann geschlossen werden, daß die C-5-Hydroxylgruppe nicht methyliert worden war.

Aglykon D enthält also drei methylierbare Hydroxylgruppen, eine Methoxylgruppe und eine Hydroxylgruppe an C-5.

Der Alkali-Abbau des Aglykon D mit 50proz. Kalilauge ergab Protocatechusäure, wie durch Pc unter Mitlaufen von authentischer Vergleichssubstanz bewiesen wurde (Rf 0,81).

Daneben entstand ein Produkt mit Rf 0,70, wahrscheinlich ein Phloroglucinderivat.

III. SUBSTANZ E

Substanz E wurde wie erwähnt immer dann erhalten, wenn vor der Extraktbereitung die hydrolysierenden Fermente nicht inaktiviert worden waren, sonst kam anstelle von Flavon E immer in etwa gleicher Ausbeute Flavon D. Danach sollte es sich bei beiden Substanzen um das gleiche Flavon, aber mit verschiedenem Zuckergehalt handeln. Die gezielte Hydrolyse von Glykosid E ergibt als einzigem Zucker Glucose.

Bemerkenswert ist, daß die saure Hydrolyse noch nach 2 Stdn. nicht quantitativ war. Diese Erfahrung macht man allgemein bei Flavonen, die an C-7 glykosidiert sind.[1)]

Das bei der Hydrolyse gewonnene Aglykon von E stimmte nach 3maligem Umkristallisieren aus 70 proz. MeOH in allen Eigenschaften mit dem Aglykon D überein. Zur Strukturaufklärung wurden hauptsächlich die Spektren herangezogen.

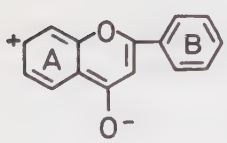
---

1) L. Hörhammer, H. Wagner u. H.S. Dhingra, Arch. Pharmaz. 22/64, 83 (1959)

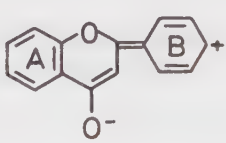
IV. UV-SPEKTROSKOPIE

a.) UV-Spektren in neutraler Lösung

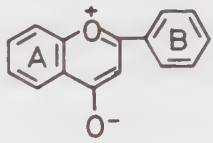
Substituierte Flavone und Flavonole zeigen die charakteristischen Maxima mehrerer aromatischer Ringe und des Benzo-γ-pyronsystems in den Bereichen 320-380 nm (Bande I) und 240-280 nm (Bande II)
Mit der Veränderung der Resonanzverhältnisse im Flavonmolekül entsprechend der Benzoyl-(4), der Cinnamoyl-(5) und der Pyronring-gruppierung (6) ändern sich Lage und Intensität der beiden Maxima.



4



5



6

Häufig überschneiden sich die in neutraler Lösung aufgenommenen Spektren, doch läßt sich aus dem unterschiedlichen spektralen Verhalten dieser Verbindungen in alkalischer Lösung ableiten, daß Bande I hauptsächlich mit der Absorption der Cinnamoylgruppe (5) und Bande II mit derjenigen der Benzoylgruppe (4) zusammenhängt[1]. So erhöht die Einführung elektronenliefernder Hydroxyl- oder Methoxyl-gruppen in den Ring B die Resonanz dieses Ringes und veranlaßt daher eine bathochrome Verschiebung der Bande I. Entsprechend werden durch Substitution im Ring A Lage und Intensität des Maximums der Bande II verändert.

---

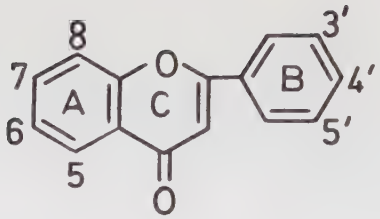
1) L. Jurd in T.A. Geissman: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press (London) 1962 S. 108

Obwohl sich Flavonspektren teilweise überlagern, lassen sich, - ausgehend vom unsubstituierten Flavon - mit Maxima bei 297 und 250 nm -, nach Substitution an verschiedenen Stellen des Moleküls anhand zahlreicher Beispiele folgende Beobachtungen machen:
Eine C-3-Substitution verursacht eine beträchtliche Bathochromie der Bande I (Flavonol).
Eine C-5-Substitution verschiebt beide Banden bathochrom.

Substitution an C-7 läßt, - entgegen der Erwartung, - Bande II unberührt, verschiebt aber Bande I bathochrom.
Tritt zum 5,7-Dihydroxyflavon (Chrysin) ein C-4'-Substituent (Apigenin), so verschiebt sich der Regel entsprechend Bande I. Die weitere Substitution an C-3' erhöht die Resonanz des schon vorhandenen C-4'-Substituenten und veranlaßt eine bathochrome Verschiebung der Bande I um ca. 10 nm (Luteolin). Hier tritt gleichzeitig eine zusätzliche Bande bei 270 nm auf, die für eine o-Dihydroxygruppierung im Seitenphenyl charakteristisch ist und bei monosubstituiertem Seitenphenyl, - soweit zu übersehen ist, - niemals auftritt. Eine C-3'-Substitution allein kanndiesen Effekt nicht herbeiführen; vielmehr ist der Haupttyp der Resonanz derselbe wie bei Flavon selbst, und das Spektrum kann nicht verändert werden (7).

7

Die folgende tabellarische Übersicht gibt Belege für diese Beobachtungen und stellt die ermittelten Meßwerte von Flavon D gegenüber.



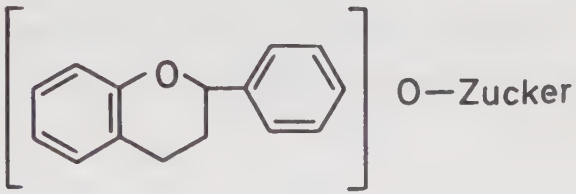
8

Flavongrundgerüst

Substitution						
	A-Ring	B-Ring	C-Ring	Trivialname	Bande I	Bande II
	OH	OH	OH			
1	-	-	-	Flavon	297(4.20)	250(4.07)
2	-	-	3	Flavonol	347	239
3	5	-	-	-	337(3.88)	272(4.35)
4	7	-	-	-	308(4.50)	250(4.33)
5	5,7	-	-	Chrysin	318(4.08)	270(4.45)
6	5,7	4'	-	Apigenin	340(4.31)	265(4.25)
7	5,7	3'4'	-	Luteolin	350(4.17)	255(4.13) 268^{x}
8	-	4'	-	-	327	251
9	-	2'4'	-	-	334	249
10	5,7	3'4'	3	Quercetin	375(4.32)	258(4.32)
11	5,7	3'4'5'	3	Myricetin	377(4.40) 308(3.92)	258(4.32)
12				Aglykon D	350(4.29)	273(4.15) 254(4.15)
13				Glykosid D	350(4.26)	273(4.15) 256(4.14)

Tab. 5: UV-Maxima verschiedener Flavonoide[1,2)]
x = Inflexion

Vergleicht man in der Tabelle 5 die Maximawerte von Quercetin und Myricetin, so fällt auf, daß eine zusätzliche C-5'-Substitution keinen erkennbaren Einfluß auf das Spektrum nimmt. Die Erkennung einer Pyrogallolstruktur im Seitenphenyl kann aber mit Hilfe der Spektren der reduzierten Produkte erfolgen. Nach K. Hayashi[3] bedingt ein C-4'-Substitent bei Anthocyanen 9 das Auftreten einer Zwischenbande bei 300-330 nm.



9

Diese Bande verschwindet bei zusätzlicher C-3'-Substitution. Kommt aber eine C-5'-Substitution zur 3'4'-Dihydroxygruppe hinzu, so wird der Einfluß des 3'-Hydroxyls aufgehoben, und die Zwischenbande tritt wieder in Erscheinung.

Da beim reduzierten Aglykon D keine solche Zwischenbande feststellbar war, ist eine C-3'4'5'-Substitution im Seitenphenyl auszuschließen. Die gute Übereinstimmung der Maximawerte des reduzierten Aglykons D mit dem Maximum bei 490 nm und derjenigen des reduzierten Luteolins mit dem Maximum bei 495nm[1] macht wahrscheinlich, daß Flavon D ein Luteolinderivat ist, ebenso die große Ähnlichkeit der Spektren in alkoholischer Lösung. Es kann sich aber bei D nicht um Luteolin selbst handeln.

---

1) K. Venkataraman in L. Zechmeister: Fortschritte der Chemie org. Naturstoffe, Wien, Springer-Verlag 1959 S. 57
2) L. Jurd in T. A. Geissman: The Chemistry of Flavonoid Compounds Pergamon Press (London) 1962 S. 111-114
3) K. Hayashi, Act. Phytochim. 7, 143 (1933)

Zur Festlegung der Stellung der einzelnen Substituenten am Flavonmolekül bedarf es einiger Reaktionen, nämlich mit

1.) Borsäure und Natriumacetat
2.) Natriumäthylat
3.) Aluminiumchlorid
4.) wasserfreies Natriumacetat

b.) UV-Spektren in Natriumacetat-Borsäure-Lösung

Zur Klärung der Substitutionsverhältnisse im Seitenphenyl von Flavon D wurde die UV-Verschiebung bei Zusatz von Natriumacetat und Borsäure herangezogen. Nach L. Jurd[1] cheliert Borsäure in Gegenwart von Natriumacetat mit Flavonen, welche eine o-Dihydroxygruppierung im Seitenphenyl enthalten und bewirkt dabei eine Bathochromie des ersten Macimums um ca. 25 nm. Eine Verschiebung dieser Größenordnung zeigte sowohl Glykosid D als auch Aglykon D. Demnach waren bei Glykosid D beide Hydroxylgruppen frei. Wäre die 4'-Hydroxylgruppe durch Glykosidierung besetzt gewesen, hätte Bande I nicht verändert werden dürfen, wie das am Beispiel Luteolin-4'-glykosid und Spiräosid gezeigt ist. Die Meßwerte von Glykosid D und Aglykon D stehen in gutem Einklang mit den in der Tabelle 6 aufgeführten Literaturbeispielen. Flavon D muß dieselbe Struktur im Seitenphenyl besitzen wie die Beispiele 2, 4, 5 der Tabelle 6.

---

1) L. Jurd, Arch. Biochem. Biophys. 63, 376 (1956)

No	Flavon	Trivialname	Methanol		Bors.+NaOAc.		Verschiebung	
			max I	max II	max I	max II	max I	max II
1	3, 5, 7, 3'-Tetra-hydroxy-4'gl.	Spiräosid[1)]	366	254	368	253	+ 2	-1
2	5, 7, 3', 4'-Tetra-hydroxy-flavon	Luteolin[1)]	350	256	375	261	+25	+5
3	5, 7, 3'-Trihy-droxy-4'-glyk.	Luteolin-4'-glykosid	335	270	338	269	+ 3	+1
4	5, 3', 4'-Trihy-droxy-7-glyk.	Luteolin-7-glykosid	352	256	377	261	+25	+5
5	5, 7, 3', 4'-Tetra-hydroxy-8-gl.	8-Glykosyl-Luteolin (Orientin)[2)]	351	257	377	263	+25	+6
6		Glykosid D	350	256	375	263	+25	+7
7		Aglykon D	350	254	375	261	+25	+7

+ = Verschiebung nach längeren Wellen
- = Verschiebung nach kürzeren Wellen

Tab. 6: Maximaverschiebung mit Natriumacetat-Borsäure

1) L. Hörhammer, H. Wagner, W. Leeb, Arch. Pharmaz. 293/65, 264 (1960)
2) L. Hörhammer, F. Goggengießer, Arch. Pharmaz. 291/63, 128 (1958)

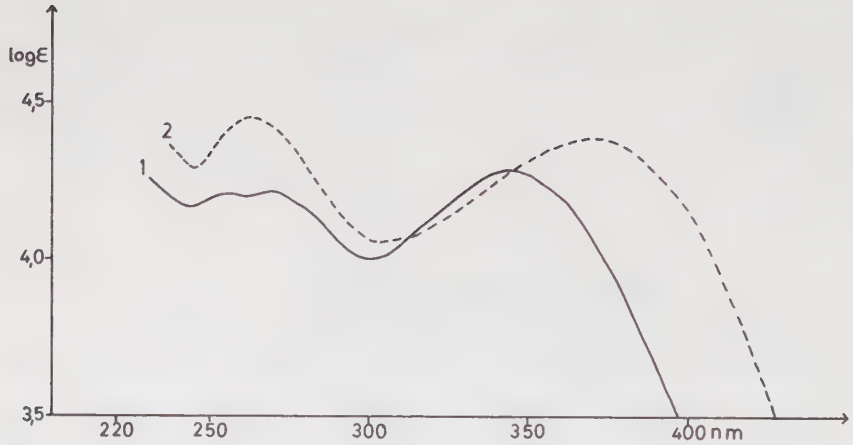


Abb. 9: UV-Spektrum des Glykosids D in neutraler (1) und in Natrium-acetat-Borsäure-Lösung (2)

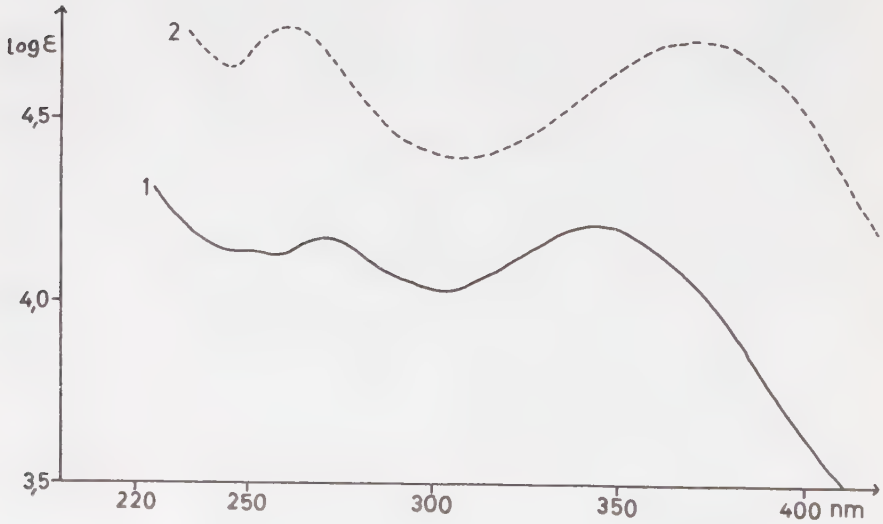


Abb. 10: UV-Spektrum des Aglykons D in neutraler (1) und in Natrium-acetat-Borsäure-Lösung (2)

c.) UV-Spektren in Natriumäthylatlösung

Natriumäthylat ionisiert alle phenolischen Hydroxylgruppen mit Ausnahme der sterisch behinderten[1]. Ob trotz der universellen Wirkung von Natriumäthylat Maximaverschiebungen bestimmten Substitutionen zuzuordnen sind, untersuchten C.G. Nordström und T. Swain[2] an Apigenin, Luteolin und deren partiell methylierten Derivaten. Dabei erkannten sie die Regelmäßigkeit, daß Bande I gleichbleibend um 50-60 nm bathochrom verschoben wird, wenn an C-4' eine freie Hydroxylgruppe vorhanden ist (4'Hydroxy-5-7-dimethoxy-flavon), und Bande II um ca. 20 nm bathochromer erscheint bei Anwesenheit einer freien C-5-Hydroxylgruppe (3', 4', 7-Trimethoxy-luteolin und 4', 7-Dimethoxy-apigenin). Weiterhin sind nach E.B. Dechene[3] 3-Glykosido- und 3-Methoxy-flavonole - im Gegensatz zu ihren Aglykonen - in Gegenwart von Natriumäthylat stabil und verschieben das Maximum der ersten Bande in den Wellenbereich 380-420 nm. Flavonole mit freiem C-3-Hydroxyl sind demgegenüber unstabil, d.h. Bande I verschwindet innerhalb weniger Minuten, wenn gleichzeitig eine weitere freie Hydroxylgruppe an C-4' vorhanden ist (3, 3', 4'-Trihydroxy-flavon). Beim Aglykon D erschien je ein Maximum bei 410 und 273 nm, also war Bande I um 60 und Bande II um 19 nm nach länger verschoben. Dieser Befund spricht für freie Hydroxylgruppen an C-5 und C-4'. Nach der Stabilität des Spektrums von Aglykon D kann ferner kein freies C-3-Hydroxyl vorliegen. Da aber schwer hydrolysierbare C-3-Flavonglykoside bisher nicht bekann sind, darf angenommen werden, daß die Zucker nicht an C-3 gebunden waren.

Offen bleibt noch die Frage, ob ein C-3-Methyläther vorliegt oder ob Aglykon D ein Flavon ohne C-3-Substitution ist. Das Ausmaß der Verschiebungen mit Natriumäthylat läge in beiden Fällen in derselben Größenanordnung (vgl. 3-0-Methylquercetin und Orientin (Tab. 7). Nach diesem Verhalten von Glykosid D sind das C-5- und das C-4'-Hydroxyl frei.

---

1) L. Jurd und R.M. Horowitz, J.org.Chem. 22, 1618 (1957)
2) G.H. Mansfield, T. Swain und C.G. Nordström, Nature 172, 23 (1953)
3) E.B. Dechene, J.Am.Pharm.Assoc. 40, 495 (1951)

Die Verschiebung der Bande I des methylierten Aglykons D um 13 nm und die unveränderte Lage des ersten Maximums decken sich mit den Verhältnissen des 3', 4', 7-Trimethoxyluteolins und führen zu der Annahme, daß die C-5-Hydroxylgruppe von Aglykon D bei der Methylierung nicht berührt wurde.

	Methanol		Natrium-Äthylat	
Flavon	λmax I	λmax II	Δλmax I	Δλmax II
5, 7, 4'-Tri-hydroxy-flavon (Apigenin)	335	269	+60	+ 9
5, 7, 3', 4'-Tetra-hydroxy-flavon (Luteolin)	352	259	+60	+12
4'-Hydroxy-5, 7, -dimethoxy-flavon	327	259	+53	+ 3
3', 4', 7-Trimethoxy-luteolin	338	272	0	+16
4', 7-Dimethoxy-apigenin	325	271	0	+21
3, 3', 4'-Tri-hydroxy-flavon	368	250	-	-
3-Methoxy-quercetin	360	258	+52	+20
8-Glykosyl-5, 7, 3', 4'-tetra-hydroxy-flavon (Orientin)	355	272	+60	+14
Aglykon D	350	254	+60	+19
Glykosid D	350	256	+50	+18
methyliertes Aglykon D	336	273	0	+13

Tab. 7: UV-Spektren in Natriumäthylatlösung (0, 002 m)

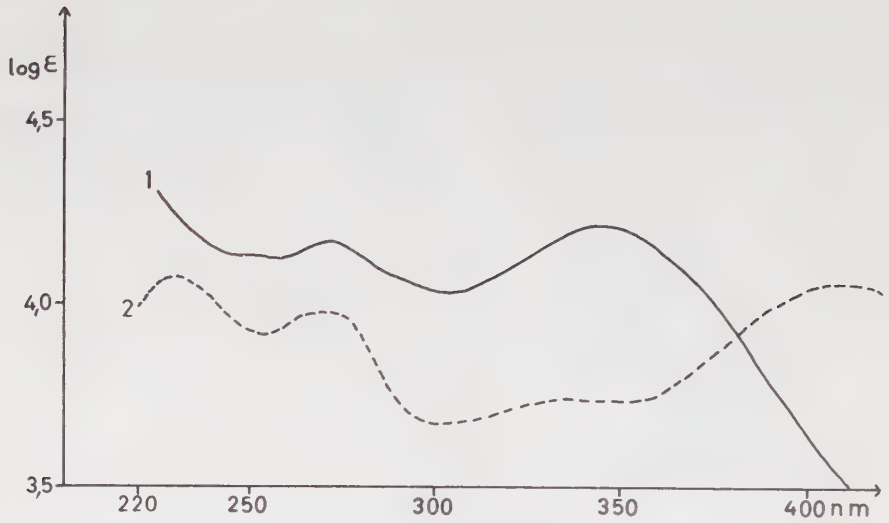


Abb. 11: UV-Spektrum von Aglykon D in neutraler (1) und in Natrium-äthylatlösung (2)

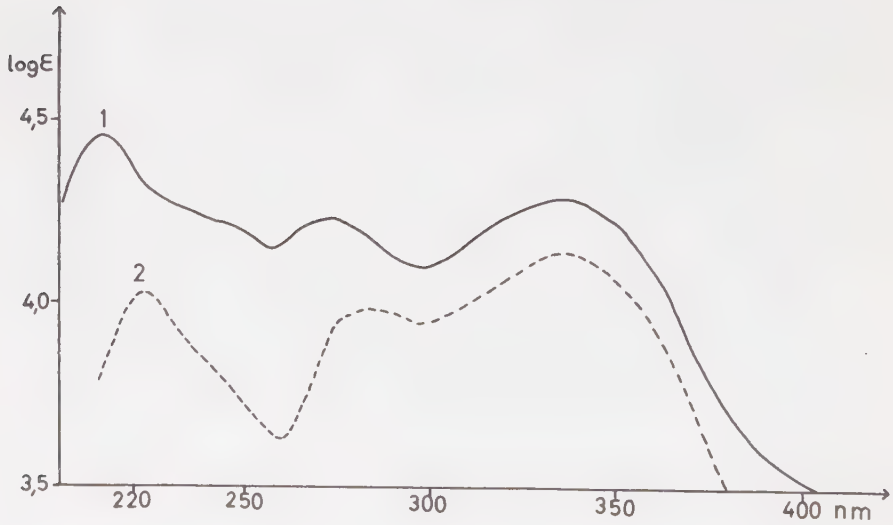
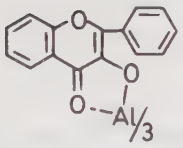


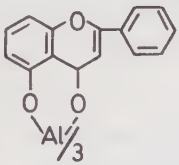
Abb. 12: UV-Spektrum des methylierten Aglykons D in neutraler (1) und in Natriumäthylatlösung (2)

d.) UV-Spektren der Aluminiumchelatkomplexe

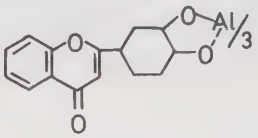
Für das Vorliegen eines freien C-5-Hydroxyls bei Glykosid D, Aglykon D und beim methylierten Aglykon D sprach ferner das Spektralverhalten der Aluminium-Flavon D-chelatkomplexe. Bekanntlich chelieren Metalle mit Polyhydroxyflavonen, welche die 3-Hydroxy-4-carbonyl-(10) und/oder die 5-Hydroxy-4-carbonyl (11) und/oder eine Brenzcatechin-gruppe im Seitenphenyl enthalten[1]. 12



10



11



12

Die veränderte Resonanzstruktur solcher Komplexe bedingt denn auch eine beträchtliche Bathochromie beider Banden. In den meisten Fällen entstehen bei jeder Bande zwei Maxima oder ein Maximum und eine Inflexion[1]. Voraussetzung zur Bildung der Spektralveränderung ist aber eine durchgehende Konjugation von Doppelbindungen im Molekül[2].
Ist beispielsweise - wie bei den Isoflavonen - die Konjugation zwischen Seitenphenyl und Chromonsystem unterbrochen, so müssen die Maxima bei kürzeren Wellen liegen[3].

Schon bei den Spektren der freien Isoflavone erscheinen sie außerhalb des Bandenbereichs der Flavone. Die Verschiebungen der Isoflavon-Aluminium-Komplexe sind gering[4].

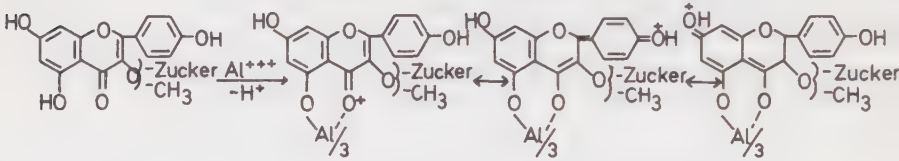
Auch bei Flavanonen und Flavanonolen, bei denen die C-Atome 2 und 3 gesättigt sind, steht das Seitenphenyl isoliert vom Hauptchromophor. Infolge-

---

1) L. Jurd in T.A. Geissman: The Chemistry of Flavonoid Compounds Pergamon Press (London) 1962 S.119-122
2) J.B. Harborne, Chem. u. Ind. London 1142 (1954)
3) T. Swain, Chem. u. Ind. London 1148 (954)
4) E.C. Bate-Smith, T. Swain und G.S. Pope Chem. u. Ind. 1127 (1953)

dessen wird auch hier das Spektrum durch Aluminiumchlorid kaum verändert.

Aglykon D verschob Bande I um 75 nm und Bande II um 20 nm bathochrom. Solche Werte sprechen für das Vorliegen eines Flavons oder Flavonols mit freiem C-5-Hydroxyl[1]. Dies steht auch im Einklang mit den Angaben von T. Swain[2], wonach der Chelateffekt wesentlich an die peri-Stellung von Hydroxylen zur Carbonylgruppe gebunden ist und eine Verschiebung der Bande I um 40-75 nm bedingt. Flavone mit einem freien C-5-Hydroxyl oder Flavonole mit freier C-5-, aber geschützter C-3-Hydroxylgruppe bilden stabile Aluminiumkomplexe folgender Struktur (13):



13

1) L. Jurd, R.M. Horowitz, J.org.Chem. 21, 1398 (1956)
2) T. Swain, Chem. u. Ind. (London) 1480 (1954)

	Methanol			Aluminiumchlorid				Verschbg.	
	Band I		Band II	I a	I b	II a	II b	I	II
Glykosid D	350	272	256	427	354	298	274	+77	+18
Aglykon D	350	271	254	426	350	305	274	+76	+20
meth. Agl. D	338	273	238	365	290	240		+26	+17

Tab. 8: UV-Spektren der Aluminiumchelatkomplexe.

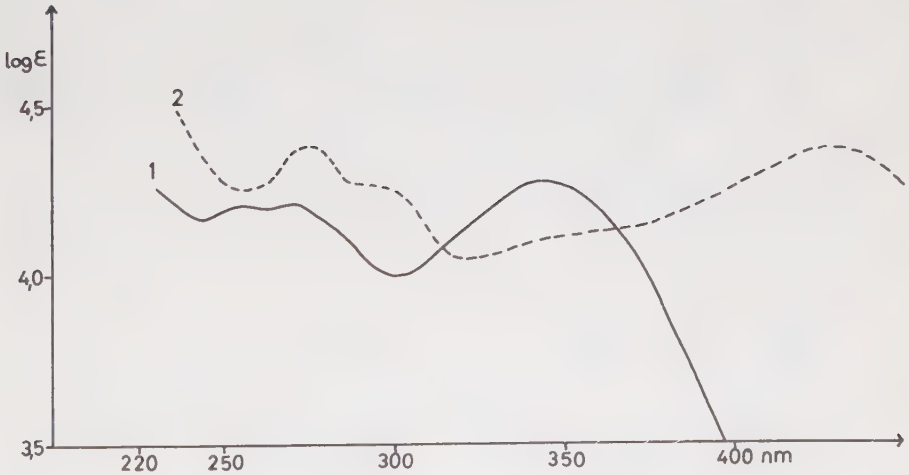


Abb. 13: UV-Spektrum von Glykosid D in neutraler (1) und in Aluminiumchloridlösung (2)

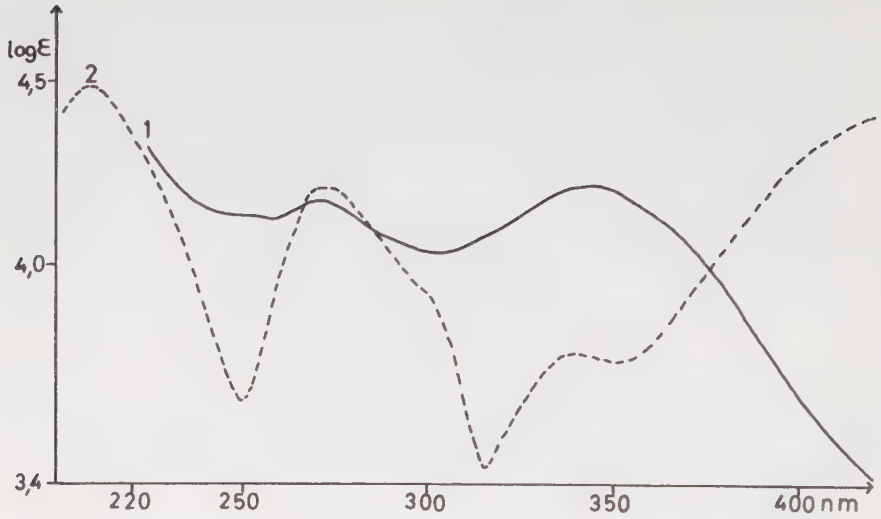


Abb. 14: UV-Spektrum von Aglykon D in neutraler (1) und in Aluminiumchloridlösung (2)

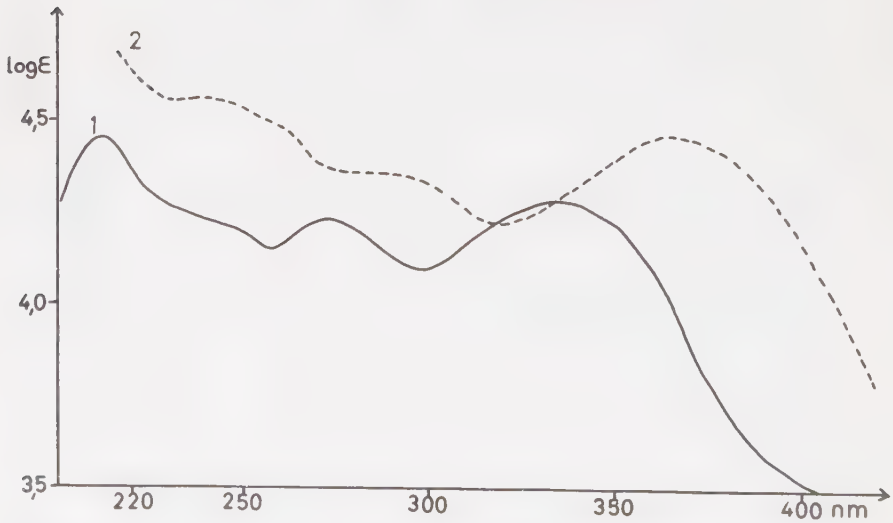


Abb. 15: UV-Spektrum des methylierten Aglykons D in neutraler (1) und in Aluminiumchloridlösung (2)

e.) Spektralverschiebung mit Natrium-Acetat

Nach dem Beweis, daß Aglykon D ein Flavonglykosid mit o-Dihydroxy-gruppierung im Seitenphenyl und freiem C-5-Hydroxyl ist, und daß die Zucker weder an C-3, noch an einem der beiden Hydroxyle des Seitenphenyls gebunden sind, kommen für die Stellung der Zucker bei einem Luteolinderivat nur noch die C-Atome 6, 7 oder 8 in Frage. Die Entscheidung hierüber soll nun mit Hilfe der Maximaverschiebung im Natriumacetatmilieu erfolgen.

T. Tasaki[1)], S. Hattori[2)], L. Marschlewski[3)] und T.A. Geissman[4)] fanden an Flavonglykosiden die Gesetzmäßigkeit, daß die Lage der Absorptionsmaxima von C-7-Glykosiden mit denjenigen der zugehörigen Aglykone übereinstimmt. Später bestätigten L. Hörhammer, H. Wagner und F. Gloggengiesser[5)] am Orientin und Orientosid diese Regel. Nach B. Skarzynski[6)] erfahren die UV-Absorptionsmaxima einfacher Phenole eine bathochrome Verschiebung, wenn man neutrale Lösungen alkalisiert. Dies wurde von T. Swain zur Identifizierung phenolischer Pflanzenstoffe benutzt.

C-8-substituierte Flavonglykoside verändern das normale Spektrum nicht[6)], und bei gleichzeitiger C-7-8-Substitution verschiebt das saurere Hydroxyl auf Natriumacetatzusatz stärker bathochrom; dies sei aber nach theoretischen Überlegungen und praktischen Erfahrungen das C-7-Hydroxyl.[7)]

L. Jurd, T.A. Geissman und M.K. Seikel[8)] untersuchten an phenolischen Säuren und an Flavonen die Natrium-acetatverschiebung und fanden, daß Verbindungen mit freier C-7-Hydroxylgruppe nach Zugabe festen Natriumacetats zur neutralen, alkoholischen Lösung die Bande II um 8-19 nm bathochrom verschieben. Verbindungen, bei denen ein C-7-Hydroxyl ent-

---

1) T. Tasaki, J.chem.Soc. Japan 47, 299 (1926)
2) S. Hattori, Acta Phytochem. Tokyo 4, 63 (1928)
3) L. Marschlewski, B. Skarzynski, Biochem.Z. 297, 56 (1938)
4) T.A. Geissman in K. Paech und M.V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin, Göttingen-Heidelberg, 1955 Bd III
5) L. Hörhammer, H. Wagner, F. Gloggengiesser, Arch.pharmaz. 128 (1958)
6) B. Skarzynski, Biochem.Z. 301, 150 (1939)
7) L. Jurd und R.M. Horowitz, J.org.Chem. 21, 1395 (1956)
8) L. Jurd, T.A. Geissman und M.K. Seikel, Arch.Biochem.Biophys. 67, 284 (1957)

weder nicht vorhanden oder durch Alkyl oder Zucker geschützt ist, zeigen keine ausgeprägte Verschiebung dieser Bande. Die gleichen Autoren konnten überzeugend nachweisen, daß sich der Alkali-effekt von Hydroxylgruppen an den C-Atomen, 3, 5, 8, 3' und 4' mit dem eines freien C-7-Hydroxyls nicht überschneiden. Es konnte ebenfalls bestätigt werden, daß Bande II mit der Absorption im Ring A und im Heteroring zusammenhängt und die Verschiebung mit der Ionisation des C-7-Hydroxyls verknüpft ist.

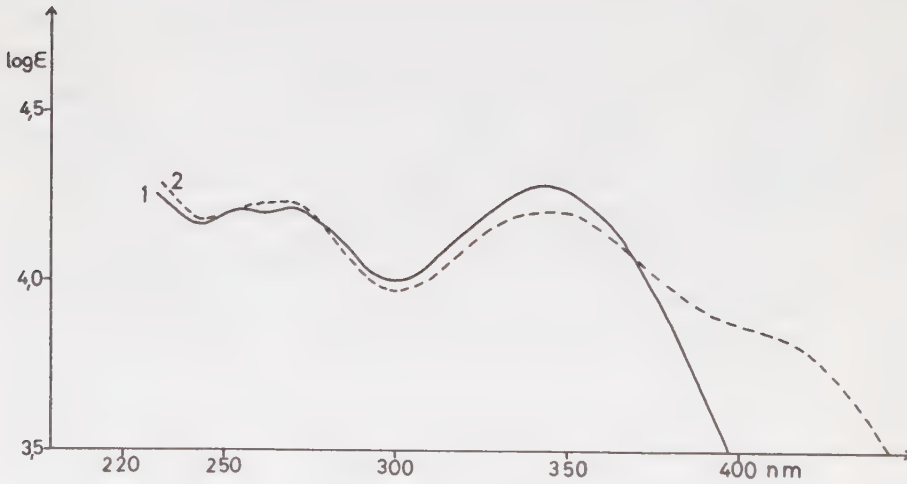


Abb. 16: UV-Spektrum von Glykosid D in neutraler (1) und in Natriumacetat-Lösung (2)

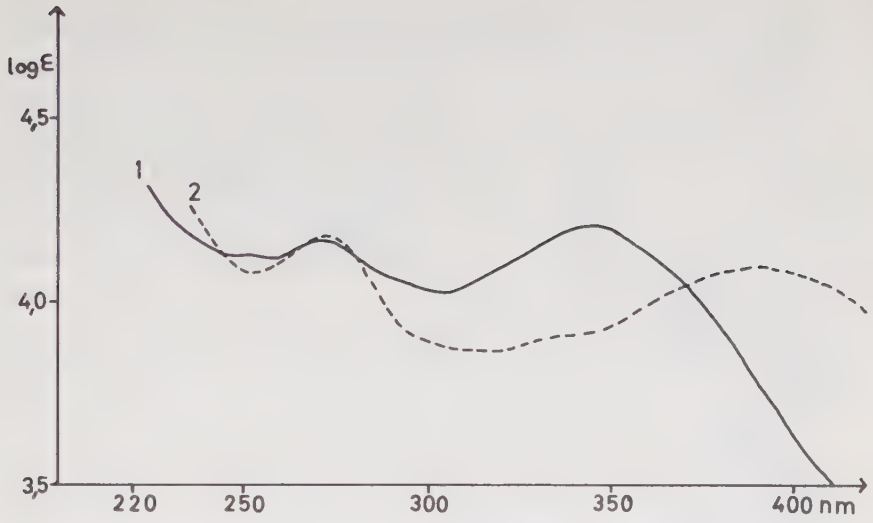


Abb. 17: UV-Spektrum von Aglykon D in neutraler (1) und in Natriumacetat-Lösung (2)

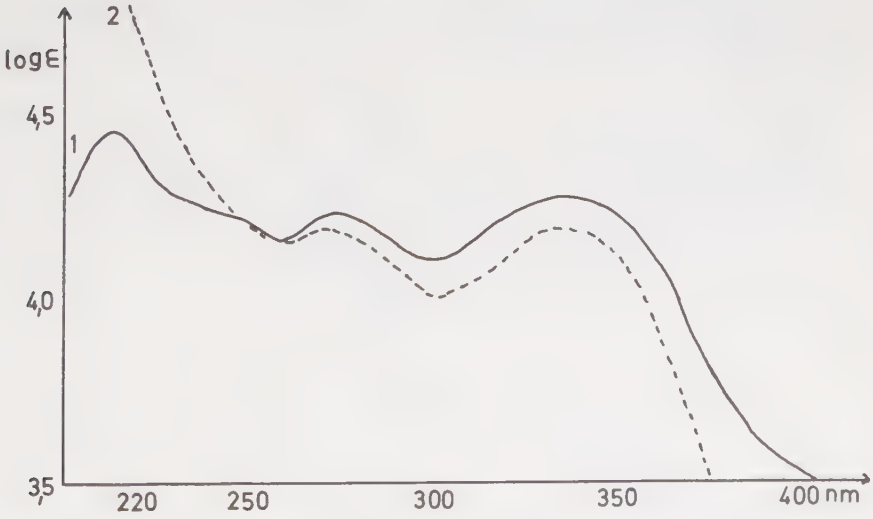


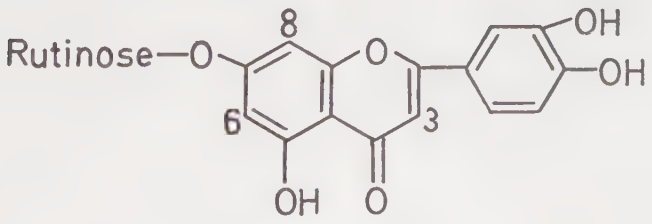
Abb. 18: UV-Spektrum des methylierten Aglykons D in neutraler (1) und in Natriumacetat-Lösung (2)

		Methanol	Methanol + Natriumacetat	Verschiebung
		λmax II	λmax Band II	
3, 5, 7, 8, 3', 4'-Hexahydroxy-flavon	Gossypetin	262	-	-
Gossypetin-8-glucosid	Gossypin	262	281	+19
Gossypetin-7-glucosid	Gossypitrin	262	262	0
5, 3', 4'-Trihydroxy-flavon-7-0-glucosid	Luteolin-7-glucosid	257	262	+ 5
5, 7, 4'-Trihydroxy-flavon-8-0-glucosid	Saponarin	272	271	- 1
Luteolin-8'-0-glucosid	Orientin	258	276	+18
Glykosid D		256	262	+ 6
Aglykon D		256	272	+18
methyl. Aglykon D		270	272	+ 2

Tab. 9: Maximaverschiebungen mit Natriumacetat

Gossypetin ist 3, 5, 7, 8, 3', 4'-Hexa-hydroxy-flavon und Gossypin sein 8 Glucosid. Bei letzterem wird wegen des freien C-7-Hydroxyls Bande II mit Natriumacetat um 19 nm bathochrom verschoben. Beim Gossypitrin als dem Gossypetin-7-glucosid ist umgekehrt das C-8-Hydroxyl frei; daher wird regelgerecht Bande II nicht verändert. Außerdem gleicht Luteolin-7-glucosid dem Glykosid D und Orientin dem Aglykon D. Im ersteren Fall ist die 7-Hydroxylgruppe geschützt, im letzteren frei. Weitere Literaturbeispiele bestätigen diese Beobachtungen. Aus der Tabelle 9 geht hinlänglich hervor, daß die Zucker bei Glykosid D am C-7-Atom sitzen. Saponarin und das methylierte Aglykon D haben beide eine geschützte C-7-Hydroxylgruppe und zeigen entsprechendes Verhalten. Danach hat die freie C-7-Hydroxylgruppe des Aglykons D mit Diazomethan reagiert. Bei allen in Tabelle 9 angeführten Verbindungen ist die C-5-Hydroxylgruppe frei. Eine Ionisation an dieser Stelle müßte - wie schon früher dargelegt - auch Bande II verschieben. Daß dies offenbar nicht erfolgt ist (Saponarin), hängt damit zusammen, daß das C-5-Hydroxyl mit dem Carbonylsauerstoff cheliert und daher nicht mehr genügend sauer ist, um mit Natriumacetat zu reagieren.

Nach den bisherigen Befunden kann dem Glykosid D folgende Struktur zugeordnet werden:

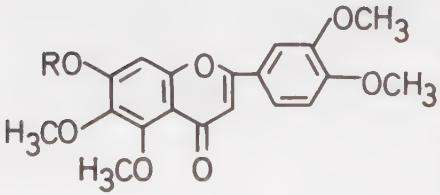


14

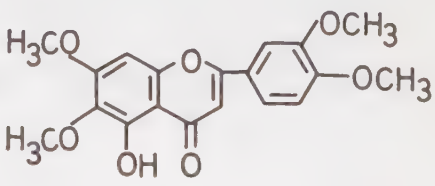
Der empirischen Zusammensetzung $C_{16}H_{12}O_7$ des Aglykons D zufolge muß sich noch eine Methoxygruppe am Molekül befinden. Für diese stehen nurmehr die C-Atome 3, 6 und 8 zur Diskussion.

Die Hydroxyle an C-5, 3' und 4' bedingen die Lage des ersten Maximums bei 350 nm. Wäre das Methoxyl an C-3 angeknüpft, so wäre Flavon D ein Quercetinderivat und Bande I müßte wie beim 3-0-Methylquercetin[1] bei 360 nm auftreten. Bei allen in der Literatur verzeichneten Quercetinderivaten und ähnlichen Flavonen mit C-3-Substitution liegt λmax der Bande I oberhalb von 350 nm. Eine C-3-Substitution scheidet demnach für Flavon D aus.

In welcher Weise sich das Spektrum des Aglykons D ändert, wenn die Methoxygruppe an C-6 gebunden ist, kann durch den Vergleich der Maximawerte des methylierten Aglykons D mit denen des methylierten Pedaliins (15) bzw. Pedalitins (16) und der Luteolin-methyl-äther demonstriert werden (Tab. 10).



15



16

1) N. Morita, Chem. Pharm. Bull, Japan 8, 59 (1960)

	max I	max II
Luteolin	350	268
Aglykon D	350	273
methyliertes Aglykon D	340	275
5, 3', 4'-Tri-methoxy-luteolin	330	278
7, 3', 4'-Tri-methoxy-luteolin	340	277
6, 7, 3', 4'-Tetra-methoxy-pedalitin	340	282
5, 6, 3', 4'-Tetra-methoxy-pedaliin-7-rutinosid	330	283

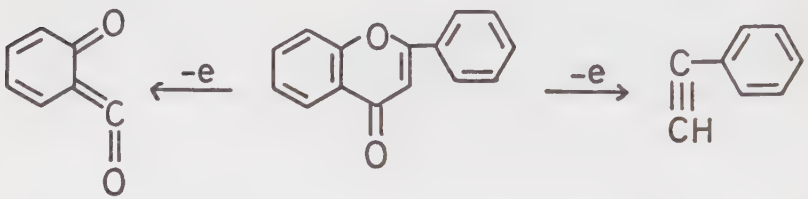
Tab. 10: UV-Spektren methylierter Flavone[1)]

Bande II des Aglykons D tritt deswegen um 5 nm langwelliger als beim Luteolin auf, weil Aglykon D am Ring A einen Substituenten mehr besitzt als Luteolin. Hätte dese Substitution am C-6 stattgefunden, so müßten sich die Maxima des methylierten Aglykons D mit denen des 6, 7, 3', 4'-Tetra-methoxypedalitins decken. Das ist nicht der Fall, also bleibt für die Methoxylgruppe nur noch die 8-Stellung übrig.

1) N. Morita, Chem. Pharm. Bull, Japan 8, 59 (1960)

V. MASSENSPEKTREN

Zur Auswertung der Massenspektren von Aglykon D und seinem Methylderivat wurde für Vergleichszwecke der Zerfall des unsubstituierten Flavons[1] herangezogen, der nach Spitteler[2] in einer für das γ-Pyron-System charakteristischen Abbaureaktion des heterozyklischen Ringes im Sinne eines Retro-Dien-Zerfalls erfolgt. Dabei entstehen zwei Schlüsselbruchstücke:



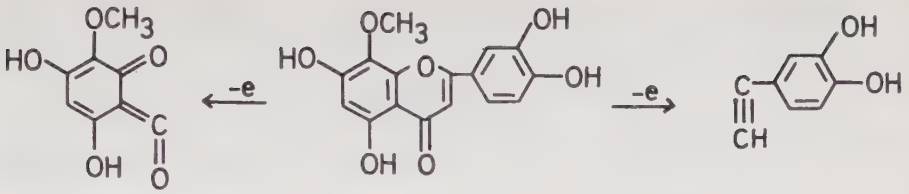
$m/e = 120$ $m/e = 222$ $m/e = 102$

17

Unter dem Gesichtspunkt, daß die Abbaureaktionen mit dem geringsten Aufwand an Energie die wahrscheinlichsten sind[3], kann dieser Zerfall auch dann bevorzugt eintreten, wenn im Flavonmolekül kerngebundene Substituenten vorhanden sind. Demnach müßte beim Aglykon D, folgende Fragmentierung erfolgen.

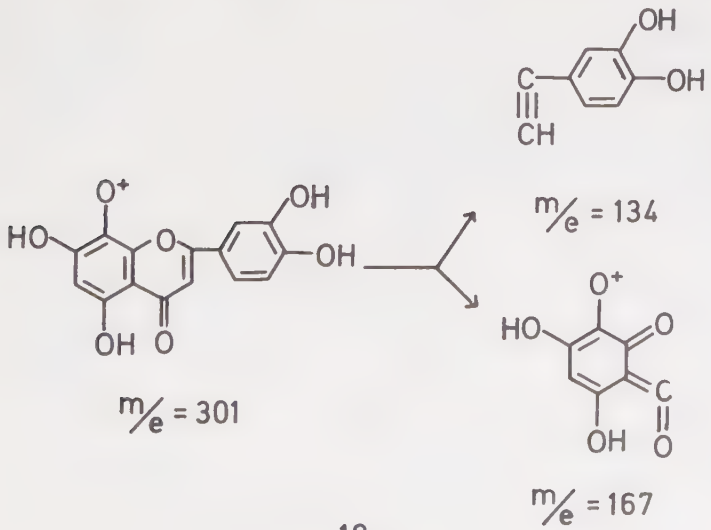
---

1) W. Simon und Th. Clerc: Methoden der Anal. in d. Chemie Bd. 7 Übungsbeispiel 38, Akad. Verlagsanstalt, Frankfurt/Main 1967
2) G. Spitteler, Massenspektr. Strukturanalyse org. Verbindungen Verlag Chemie, Weinheim 1966
3) C. Brunne und H. Voshage: Massenspektrometrie Verlag Karl Thiemig KG München 1967



18

Der Massenpeak m/e = 134 ist vorhanden und liefert einen weiteren Beweis für die Struktur des Seitenphenyls. Das Massenbruchstück m/e = 182 dagegen tritt im Massenspektrum des Aglykons D nicht auf. Statt seiner erscheint ein um 15 Masseneinheiten ärmerer, relativ intensiver Peak mit m/e = 167. Dieses Massenbruchstück könnte aus dem Fragment m/e = 182 durch CH_3-Eliminierung entstanden sein. Wahrscheinlich aber ist die CH_3-Gruppe vor dem Dien-Zerfall abgespalten worden; die Massenbruckstücke m/e = 167 und m/e = 134 sind also durch Dien-Zerfall des Bruckstücks m/e = 301 entstanden, entsprechend folgendem Schema:



19

Unter Berücksichtigung metastabiler Peaks, deren Maximum näherungsweise nach folgender Gleichung errechenbar ist:

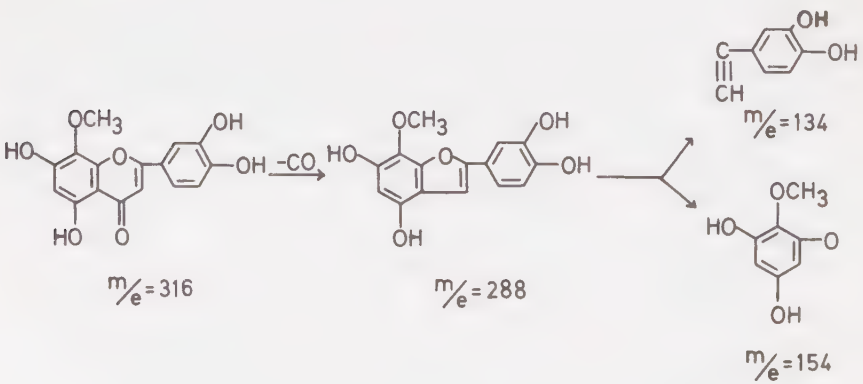
$$m^+ = m_2^2 / m_1,$$

können die nachfolgend aufgeführten Übergänge als bevorzugte Fragmentierungen bewiesen werden.

Reaktionsfolge M_1 → M_2	m^+ ber.	m^+ gef.	Eliminierung von
316 → 298	281,3	280,9	H_2O
316 → 301	286,6	286,2	CH_3
301 → 273	247,6	247,8	CO
298 → 270	244,6	243,8	CO

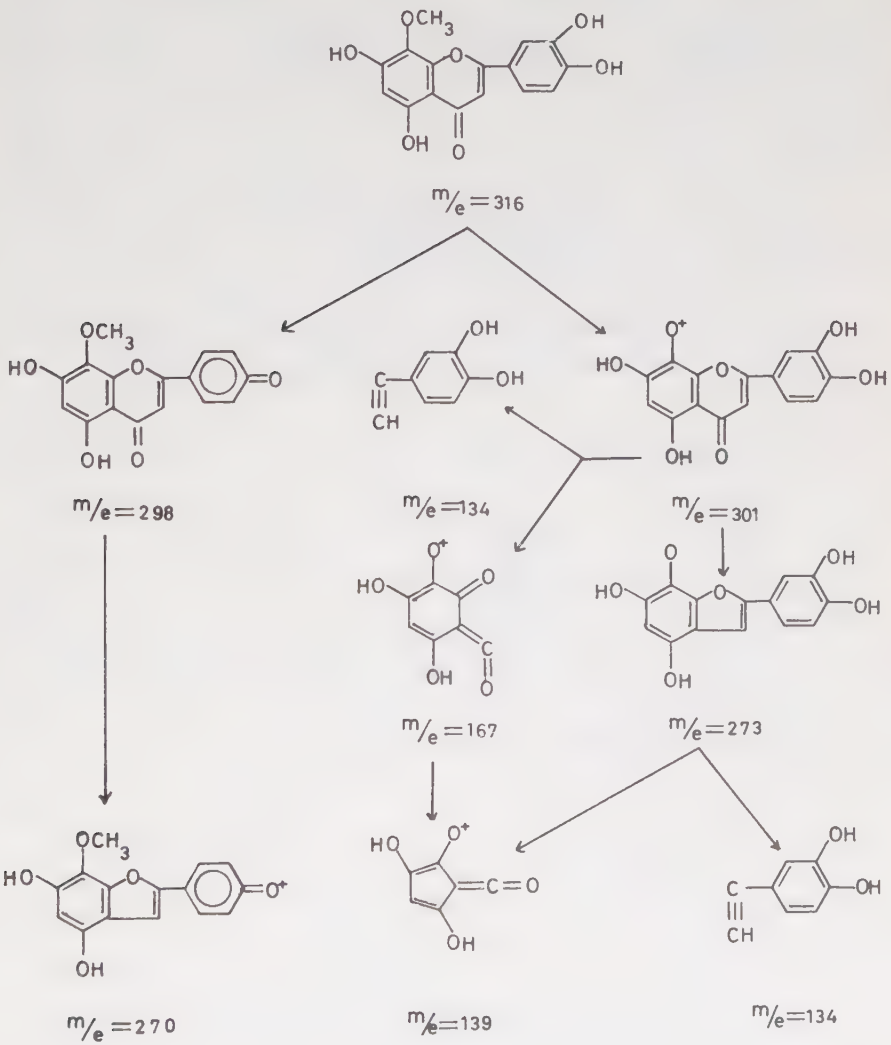
Tab. 11: Metastabile Peaks (m^+) des Massenspektrums von Aglykon D

Das Bruckstück m/e = 167 zerfällt unter CO-Abgabe weiter zu m/e = 139 und zu dem um zwei H-Atome ärmeren Fragment m/e = 137. Die Bildung des Molekülbruckstücks m/e = 154 könnte durch folgenden Zerfall erfolgt sein.

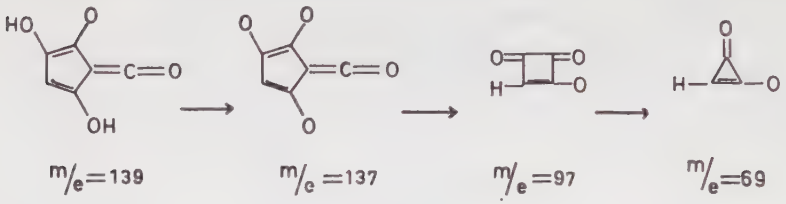


Wird aus m/e = 154 eine CH_3-Gruppe herausgenommen, so entsteht wieder das Ion m/e = 139. Dies scheint aber ein Nebenweg des Zerfalls zu sein, da die Sicherung durch metastabile Peaks nicht möglich war.

Folgendes Zerfallsschema gibt einen Überblick über die Reaktionsfolgen:



Ein denkbarer Zerfall des Massenstücks m/e = 139 wäre etwa folgender:



21

Fragment m/e = 69 tritt im Massenspektrum des Aglykons D als Basispeak auf, es muß demnach recht stabil sein.
Im Massenspektrum des methylierten Aglykons D treten die im Schema aufgezeigten Zerfallsprodukte auf, hinzu auch der Massenpeak 69; seine Intensität beträgt aber nur etwa 30 % derjenigen beim Aglykon D.

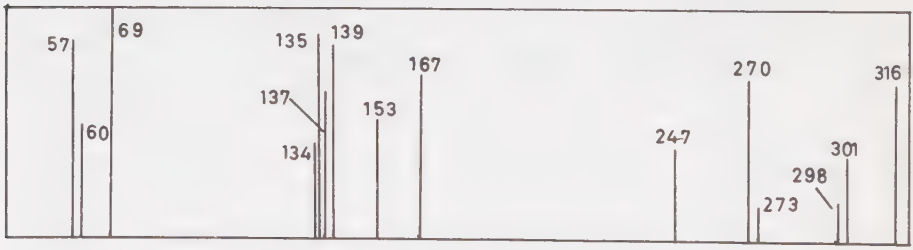


Abb. 19: Massenspektrum von Aglykon D

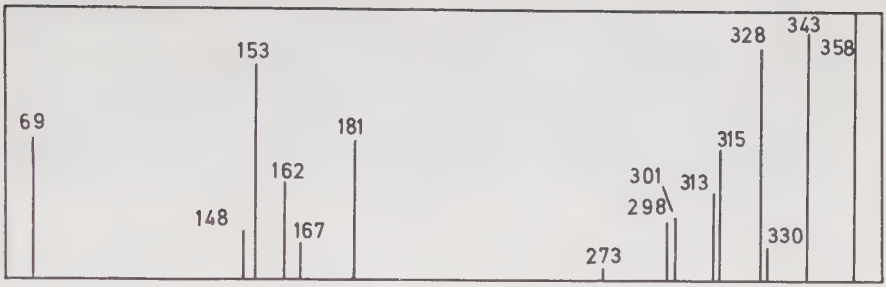
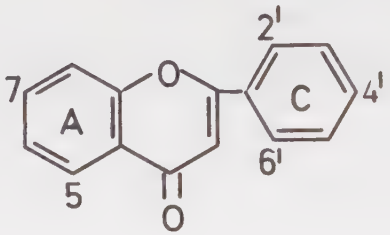


Abb. 20: Massenspektrum des methylierten Aglykons D

VI. NMR-SPEKTROSKOPIE

Nach J. Massicot und Mitarbeitern[1] können bei Flavonoiden durch den Betrag der chemischen Verschiebung die Protonen des Heterocyclus unterschieden und die aromatischen Protonen der Kerne A und C zugeordnet werden. Infolgedessen läßt sich zwischen Flavonen und Flavanonen unterscheiden und der Substitutionstyp der Ringe A und C des Grundskeletts erkennen.



22

Ist der Ring C nicht substituiert, beobachtet man bei Flavanonen und Isoflavonen ein sehr scharfes Singulett, herrührend von den fünf äquivalenten aromatischen Protonen. Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum der Flavone und Flavonole Signale der zwei Protonen H-2' und H-6' und der drei Protonen H-3'H-4' und H-5'. Im allgemeinen geben die Protonen H-3', H-4' und H-5' bei höherem Feld Resonanz als die Protonen H-2' und H-6'. Die Protonen des Ringes A zeigen immer Resonanz bei höherem Feld als die des Ringes C.[2]

Das NMR-Spektrum von Aglykon D läßt drei Seitenphenyl-Protonensignale erkennen (ABX-Typ). Das Proton H-2' veranlaßt ein Dublett bei 2,43 (I = 2 cps) das Proton H-6' ein Dublett bei 2,54 (I = 8 cps) und das Proton

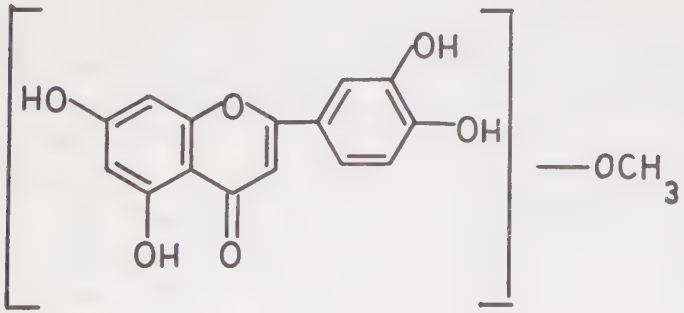
---

1) J. Massicot und J.P. Marthe, Bull.Soc.Chim.France, 1962 (1962)
2) A.C. Waiss, R.E. Lundin und D.J. Stern, Tetrahedron Letters Pergamon Press (London) 513 (1964)

H-5' bei 3,0 τ. Damit ist die 3',4'-Dihydroxy-Substitution im Ring C bestätigt.

Ein Singulett bei 6,05 τ (3H) zeigt eine Methoxylgruppe an.

Im Spektrum des Aglykons D treten außer den genannten Signalen nur noch zwei weitere Singulette bei 3,37 τ und 3,30 τ auf, die auf zwei gekoppelte Protonen hinweisen. Danach müssen im Ring A drei Protonen substituiert sein, sonst müßten in jedem möglichen Fall gekoppelte Protonen feststellbar sein, nämlich bei C-5,7,-disubstituiertem A-Ring zwei Dubletts der Protonen H-6 und H-8 mit typischer meta spin-spin-Aufspaltung bei leicht höherem Feld.
Bei Flavonen mit dieser Substitution tritt für das Proton H-3 gewöhnlich ein Signal um 3,45 τ auf. Das Singulett bei 3,37 τ kann demnach dem H-3-Proton zugeordnet werden.
Das Signal bei 3,30 τ muß demzufolge entweder dem H-6 oder dem H-8 zugeordnet werden. Eines dieser beiden Protonen ist nach dem eben Gesagten mit Sicherheit substitutiert.
Die Diskussion der NMR-Spektrums bestätigt noch einmal folgende Struktur für das Aglykon D,



23

wobei nicht entschieden werden konnte, welchem der beiden Protonen H-6 und H-8 das Signal 3,30 τ zuzuordnen ist, weil beide gleichwertig sind.

Die Stellung der Methoxygruppe konnte also nicht mit Sicherheit lokalisiert werden.

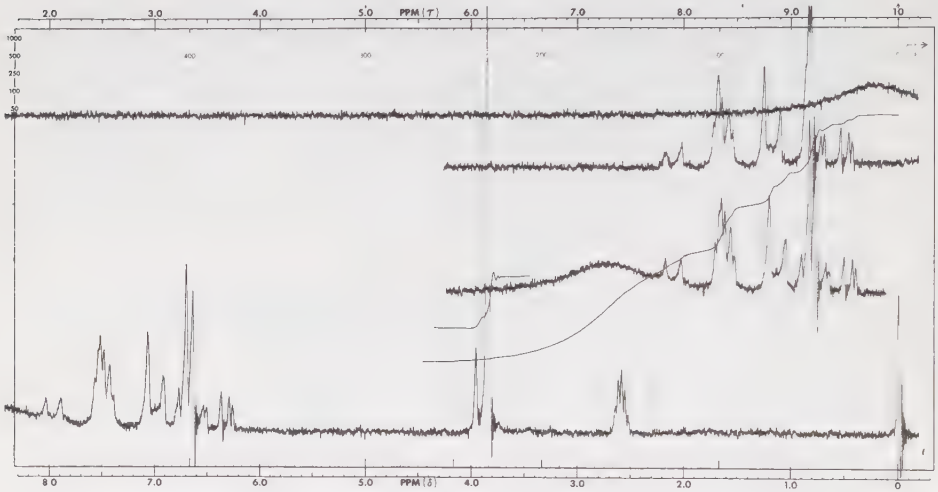


Abb. 21: NMR-Spektrum von Aglykon D

Nach Abschluß dieser Untersuchungen (Mai 1968) erschien im Juni 1968 in Tetrahedron Letters Nr. 30 pp 3447 (1968) eine Mitteilung von C.H. Brieskorn und H. Michel, in der über die Isolierung des gleichen Aglykons und dessen Glucosids berichtet wird. Die gen. Autoren weisen dem Aglykon die Formel eines 6-Methoxyluteolins (Schmp. 258-262° (Z)) und dem Glucosid die eines 6-Methoxyluteolinglucosids (Schmp. 252-256°) zu und schreiben: "Die Glucose ist wahrscheinlich in 7-Stellung gebunden."
Wenn in dieser Mitteilung auch der Peak im Massenspektrum des Aglykons mit m/e = 69, der in unserem Massenspektrum der Basispeak ist, nicht erwähnt wird, so sind doch die beiden Substanzen fraglos mit dem hier beschriebenen Glykosid D und seinem Aglykon D identisch. Ob jedoch die Methoxylgruppe an C-6 oder C-8 steht, kann aufgrund der Massen- und NMR-spektroskopie zur Zeit nicht eindeutig entschieden werden. Zwar

haben J. Massicot und J.P. Marthe[1] 1962 aufgrund kernresonanzspektroskopischer Untersuchungen von Flavonen eine Zuordnungstabelle veröffentlicht, nach der das Proton H-6 bei leicht höherem Feld erscheint als das Proton H-8, aber die Unterschiede in der chemischen Verschiebung dieser beiden Protonen sind sehr gering.

Auch bei den Bruchstücken, die bei der Massenspektrometrie entstehen, kommt man mit einer mechanistischen Deutung nicht weiter. Sichere Aussagen könnte man machen, wenn die Spektren von C-6 und C-8 methoxyliertem Flavon verglichen werden könnten. Vergleichssubstanzen standen uns aber nicht zur Verfügung.

N. Morita isolierte 1960 aus Sesamblättern ein 6-Methoxyluteolin-7-rutinosid und bezeichnete diese Substanz als Pedaliin, das Aglykon als Pedalitin[2]. Den endgültigen Strukturbeweis erbrachte er durch Synthese des 5, 6, 7, 3', 4'-Pentahydroxyflavons (Schmp. 325°) und Vergleich seines IR-Spektrums mit dem des entmethylierten Pedalitins (Schmp. 325°).

Die Synthese erfolgte analog der von F. Wessely und G.H. Moser[3] zur Darstellung des Scutellareins (5, 6, 7, 4'-Tetrahydroxyflavon) angewandten Methode: Benzylierung von Pyrogallol, Oxydation des Benzyläthers mit Salpetersäure zum 1, 4-Chinon, Reduktion mit Natriumthiosulfat, Methylierung mit Dimethylsulfat und katalytische Entbenzylierung über Palladiumkohle zum 2, 5-Dimethoxyresorcin. Daraus wurde durch Hoesch-Reaktion das 2, 4-Dihydroxy-3, 6-dimethoxy-acetophenon dargestellt, welches nach der Allan-Robinson-Methode durch Zusammenschmelzen mit Veratrumsäure und Kaliumveratrat bei 170° das 5, 8, 3', 4'-Tetramethoxy-7-hydroxyflavon ergab (Schmp. 223°). Totalmethylierung dieser Verbindung führte zu einem Produkt mit dem Schmp. 193°, während das total methylierte Pedalitin bei 173° schmolz. Wurde jedoch das Syntheseprodukt zunächst entmethyliert und danach erst vollständig methyliert, dann ergab die entstandene Verbindung mit dem total methylierten Pedalitin (Schmp. 173°) keine Schmelzpunktsdepression mehr. Morita folgerte aus dieser Tatsa-

---

1) J. Massicot und J.P. Marthe, Bull.Soc.Chim. France, 1962 (1962)
2) N. Morita, Chem.Pharm.Bull. Japan 8, 66 (1960)
2) F. Wessely, G.H. Moser, Monatsh. 56, 97 (1930)

sache, daß Entmethylierung mit Jodwasserstoffsäure zu einer Ringspaltung und anschließender Recyclisierung führe und daher das 5, 6, 7, 3', 4'-Pentahydroxyflavon aus dem entsprechenden 5, 8, -Derivat entstehe.
Weder der Schmelzpunkt des partiell methylierten Pedalitins (6, 7, 3', 4'-Tetra-methoxy-5-hydroxy-flavon) mit 190°, noch die UV-Maxima-werte der Bande II (λ = 283 nm) stimmten mit den entsprechenden Werten des partiell methylierten Aglykons D (Schmp. 181°, λ = 273 nm) überein. Demnach dürfte sich die Methoxygruppe beim Aglykon D nicht an C-6 befinden. Trifft diese Vermutung zu, dann bleibt für die Stellung der Methoxylgruppe nur C-8 übrig.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem methanolischen Mazerat von Folia Rosmarini Erg. Bd. 6 wurde durch Essigesterausschüttelung ein Flavonoidgemisch erhalten, das nach Entfernen des Lösungsmittels und Aufnahme des Trockenextraktes in Methanol durch Rechromatographie an Polyamid gereinigt wurde. Dabei resultierten zwei pc reine Flavonoide.

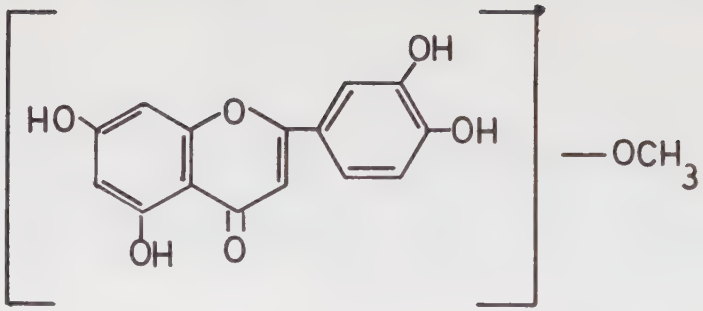
Am Hauptglykosid D, das in einer Menge von 0,03 % enthalten war, wurden Versuche zur Strukturaufklärung unternommen, während die Menge an Nebenflavonen dazu nicht ausreichte. Die durch Säurehydrolyse entstandenen Zuckeranteile ließen pc zwei Flecke erkennen. Einer davon wurde als Glucose, der andere als Rhamnose pc und gc identifiziert.

Die Stellung der Zucker konnte durch UV-Maximaverschiebungen des Glykosids und des Aglykons in Natriumacetat-Milieu bewiesen werden.

Durch Methylierung wurde der Gehalt an phenolischen Hydroxylgruppen bestimmt. Der Alkaliabbau ergab als sicher erkennbares Bruckstück Protocatechusäure, womit die Brenzkatechinstruktur des Seitenphenyls bewiesen war.

Verschiedene Farbreaktionen, so vor allem die Reduktionsteste nach Shinoda und Pew und der Zirkon-Citronensäure-Test, wiesen die Substanz D als ein Flavonderivat mit freier C-5-Hydroxylgruppe aus.

Die Deutung der NMR-, IR- und Massenspektren in Verbindung mit elementaranalytischen Ergebnissen erlauben für die Substanz D die Aufstellung einer Strukturformel, die allen gefundenen Eigenschaften entspricht.



24

Die Stellung der Methoxygruppe kann derzeit aufgrund von Spektren nicht mit Sicherheit zugeordnet werden. Durch Ausschließung anderer Möglichkeiten mit Hilfe der UV-Maxima-Verschiebung wird die Stellung an C-8 wahrscheinlich gemacht.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

VORBEMERKUNGEN

Bei allen papierchromatographischen Untersuchungen wurde Papier von Schleicher und Schüll Nr. 2043 b Mgl verwendet. Sämtliche Schmelzpunkte wurden an einem Leitz-Heiztischmikroskop bestimmt. Die CH-Bestimmungen führte teils das Mikroanalytische Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim (Ruhr), teils das Mikroanalytische Laboratorium Ilse Beetz, Kronach (Ofr.) aus, die Methoxylgruppenbestimmungen A. Bernhardt. Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte in einem Beckman Spektralphotometer IR 8 mit KBr-Presslingen. Zur Aufnahme der UV-Spektren wurde das Spektralphotometer von Beckman, Modell DB mit automatischem Schreiber verwendet. Gemessen wurde in 10 mm Küvetten in Methanol; die Konzentration betrug im allgemeinen ca. 10^{-3} Mol/l.

Die Massenspektren wurden mit einem Massenspektrometer MS 9 Furnia AEI (Manchester) im Chemischen Institut der Univ. Tübingen aufgenommen.[x] Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden mit einem F u. M-Gaschromatographen Typ 810 mit Flammenionisationsdetektor durchgeführt.

Die Kernresonanzspektren wurden mit einem Varian A-60-Spektrometer bei 60 MHz aufgenommen. Als Lösungsmittel diente hexadeuteriertes Dimethylsulfoxid. Die chemischen Verschiebungen werden in τ angegeben.

---

x Herrn Professor Dr. E. Müller und Herrn Dr. J. Heiß sei hierfür herzlich gedankt.

Isolierung der Ursolsäure

Aus der S. 1 beschriebenen Ätherfraktion wurden 30 g einer hellgrünen Masse gewonnen, die in Methanol gelöst und mit Aktivkohle gereinigt eine rote Lösung ergab, aus der nach Einengen eine krümelige orangefarbene Masse ausfiel. Diese wurde mehrere Male aus Essigester und zuletzt aus absolutem Äthanol umkristallisiert. Die resultierenden weißen, büschelförmigen Kristalle schmolzen bei 275°. Sie wurden nach den Methoden von Schindler und Herb[1] als Ursolsäure identifiziert.

Säulenchromatographie mit Polyamid

Zur Trennung auf der Polyamidsäule wurden 5 g des S. 1 beschriebenen Rohextrakts in 50 ml Methanol gelöst und auf eine Säule von 3,5 cm Durchmesser und 160 cm Länge gegeben. Zu ihrer Bereitung wurde Perlonpulver in Methanol suspendiert und in ein Glasrohr mit Abflußhahn eingefüllt. Nach Sedimentation wurde mit Methanol solange gewaschen, bis eine Probe des Eluts nach dem Verdunsten auf einem Uhrglas keinen Rückstand mehr hinterließ. Dazu waren ca. 20 l Methanol notwendig. Erst dann wurde die Substanzlösung aufgegeben. Nach ihrem Einsickern wurde mit Methanol eluiert (2 Tropfen/Sek.). Das Elut wurde mit einem automatischen Fraktionensammler in Fraktionen von 20 ml abgenommen. Die einzelnen Fraktionen wurden pc. untersucht.

Multiplikative Verteilung

Die Verteilungen wurden in einer Handapparatur nach Hecker[2] mit einer Unterphasenkapazität von 50 ml durchgeführt.
In jedes der 21 Elemente wurden 50 ml schwere Phase und in die Elemente 1, 2 und 3 noch jeweils 50 ml leichte Phase gegeben. Die Oberphasen der Elemente 2 und 3 liefen bei den Verteilungen vorneweg und benetzten die Überlaufgefäße. Gleichzeitig wurde dadurch einer Volumenabnahme der Phasen durch Verdunstung vorgebeugt.

---

1) H. Schindler und M. Herb, Arch. Pharmaz. 268/60, 374 (1955)
2) E. Hecker, Chemie-Ing. Techn. 25, 505 (1953)

In der Unterphase des Elementes 1 wurde 1 g Rohextrakt gelöst. Der Verteilungsvorgang nach Craig wurde 170mal durchgeführt, so daß am Element 21 insgesamt 150 Oberphasenfraktionen abgenommen wurden. Als Phasensystem diente die folgende Mischung: Wasser/Methanol/n-Butanol/ Petroläther (50-70°) = 4:2:3:3 (v/v). Der Verlauf der Verteilung wurde pc verfolgt. Alle 150 abgenommenen Fraktionen waren Gemische aus Flavonen und Verunreinigungen.

Isolierung der Flavonglykoside

500 g getrocknete und im Starmix zerkleinerte Rosmarinblätter wurden mit 1,0 l 90proz. Äthanol zur Fermenthemmung zwei Stunden unter Rückfluß am Sieden gehalten. Nach dem Erkalten wurde mit Wasser auf 3,0 l ergänzt, so daß das Extraktionsgemisch ca. 30 Proz. Alkohol enthielt. Es wurde vier Tage lang zur Mazeration beiseite gestellt, dann abfiltriert und abgepreßt. Der Alkohol wurde aus dem Mazerat am rotierenden Verdampfer entfernt, die wäßrige Lösung über Nacht in den Kühlschrank gestellt und von den ausgefallenen Ballaststoffen abfiltriert. Die rotbraune Lösung, die laut PC die Flavone enthielt, wurde mehrere Male nacheinander mit Petroläther (50-70°), Chloroform und Essigester ausgeschüttelt. Jede Ausschüttelung wurde mit dem jeweiligen Lösungsmittel so oft wiederholt, bis die Auszüge farblos blieben. Nach pc Untersuchungen war die Hauptmenge der Flavone in den Essigesterausschüttelungen enthalten. Diese etwa 50 Ausschüttelungen wurden daher am rotierenden Verdampfer vorsichtig zur Trockne gebracht, die mit Petroläther und Chloroform gewonnenen Extrakte verworfen. Es hinterblieben etwa 9 g eines bräunlichen, hygroskopischen Pulvers, das noch erhebliche Mengen an Harzen und anderen Ballaststoffen enthielt. Durch wiederholte Verteilung des Trockenextraktes zwischen Essigester und Wasser und durch jeweils sorgfältige Abtrennung der Essigesterphasen konnte nach Verdampfen des Lösungsmittels ein weitgehend von Harzen gereinigter Trockenextrakt erhalten werden.

Dünnschichtchromatographie

Die Versuche zur Dc mit den Adsorbentien

Kieselgel G zur DC (Merck)

Aluminiumoxid G zur DC (Merck)

Polyamid zur DC (Merck)

und den Fließmitteln

Äthylacetat/Methyläthylketon/Ameisensäure/Wasser (50:30:10:10; v/v)

Äthylacetat/Methanol (95:5; v/v)

Äthanol/Wasser (60:40; v/v)

Methanol/Eisessig/Wasser (90:5:5;, v/v)

erbrachten schlechte Trennergebnisse, weil die Flecke entweder zu Schwanzbildung neigten oder die Substanzen am Startfleck blieben. Polyamidplatten brachten zwar gut reproduzierbare Trennungen, aber dies schien wenig sinnvoll, da das Substanzgemisch schon auf Polyamid präparativ getrennt worden war.

Papierchromatographie der Polyamidfraktionen

Entwickelt wurde mit der Oberphase des Gemisches n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 (v/v). Die Unterphase wurde zur Sätigung der Entwicklungskammer verwendet. Das Entwicklungsgemisch wurde jedesmal frisch hergestellt.

Jeder zweiten Elutfraktion aus der Polyamidsäule wurde eine Probe von ca. 0,1 ml entnommen und punktförmig im Abstand von 3 cm auf Papierbogen aufgetragen. Die Laufstrecke betrug zwischen 18-22 cm. Nach dem Entwickeln wurden die Chromatogramme an der Luft getrocknet und unter UV-Licht die Substanzflecke markiert.

Aus den Papierchromatogrammen ging hervor, daß jede der untersuchten Fraktionen 2-3 Substanzen enthielt. Fraktionen mit gleichem Chromatogrammbild wurden vereinigt und vorsichtig am rotierenden Verdampfer eingeengt. Auf diese Weise erhielt man die in Abb. 4 angegebenen Fraktionsgemische a-e. Aus dem Gemisch c fiel nach Enengen die noch verunreinigte Substanz D aus. Sowohl diese als auch die anderen Gemische, aus

denen keine kristallinen Substanzen gewonnen werden konnten, wurden nochmals auf einer Polyamidsäule getrennt.

Reduktionsproben[1)]

2 ml einer etwa 10^{-3} molaren Lösung von Glykosid D und Aglykon D wurden in je einem Reagenzglas, das 50 mg Magnesiumspäne enthielt und zur Kühlung in ein Gefäß mit eisgekühltem Wasser eintauchte, mit insgesamt 0,5 ml konz. Salzsäure in 5 Portionen mit jeweils 5 Min. Abstand tropfenweise unter leichtem Umschütteln versetzt. Nach jeder Salzsäurezugabe wurde das Reagenzglas verstöpselt.
Die so behandelte Flavonlösung wurde eine Stunde nach der letzten Salzsäurezugabe gegen eine Vergleichslösung absorptionsspektroskopisch gemessen.
Solche Lösungen wurden auch für die

Reaktionen beim Alkalisieren (Beweis von -OH an C-4')

verwendet. Dazu wurden 5 ml der orange gefärbten Lösung des reduzierten Aglykons D und der entsprechenden Glykosidlösung mit einer Spatelspitze Natriumhydrogencarbonat versetzt. Es trat sofort eine blauviolette, nicht lange haltbare Färbung auf.
Bei einem analogen Versuch wurde festes Natriumacetat verwendet. Es entstand eine ebenfalls unbeständige, blaue Farbe.
Mit konz. Ammoniak bildete sich bei diesem Versuch eine gelb-grüne Farbe.

1) L. Hörhammer und K.H. Müller Arch.Pharmaz. 287/59, 379 (1954) u. 452 (1954)

Zirkon-Zitronensäure-Test[1)]

Auf dem Papierchromatogramm

Die Laufbahnen des Papierchromatogramms wurden mit einer zweiproz. methanolischen Lösung von Zirkonoxychlorid besprüht, bis das Papier feucht glänzte. Nach Markieren der Flecke und Trocknen wurde mit einer 5proz., wäßrigen Zitronensäurelösung kräftig besprüht.

Im Reagenzglas

1,2 mg Glykosid D wurden in einem Meßkolben von 50 ml Inhalt in 10 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 1 ml einer 2proz. methanolischen Zirkonoxychloridlösung fügte man anschließend 1 ml einer 2proz. Zitronensäurelösung hinzu und brachte schließlich mit Wasser auf ein Endvolumen von 50 ml. In einer zweiten Probe wurden 0,5 mg Aglykon D auf dieselbe Weise behandelt.

1) L. Hörhammer, H.J. Gehrmann und L. Endres, Arch. Pharmaz. 292/64, 113 (1959)

Rhodamin B-Reagens[1)]

a) Die Papierchromatogramme wurden mit einer 0,1 proz. Lösung des Reagenzes in 4 proz. Salzsäure besprüht.

b) Es wurde eine 0,015 proz. Lösung von Rhodamin in Eisessig hergestellt und derart verdünnt, daß in der Gebrauchslösung die Konzentration in 100 ml Eisessig 15 mcg Rhodamin betrug. Diese geringe Konzentration war notwendig, weil sonst die gelöste Menge an Flavon hätte zu groß sein müssen.

1) R. Neu, Arch. Pharmaz. 292/64, 431 (1959

Elementaranalyse der Substanz D

Zur Elementaranalyse wurde die pc reine Substanz in der Trockenpistole bei 120° über Phosphorpentoxid getrocknet.

$C_{28}H_{28}O_{16}$ (620,5)	Ber.	C 54,20	H 4,55
	Gef.	C 54,13	H 4,48
		C 54,09	H 4,64
		C 53,37	H 4,86

Säurehydrolyse von Glykosid D

48,1 mg Substanz D wurden in 10 ml Methanol gelöst, mit 20 ml 0,5 n HCl versetzt und bei 120° Ölbadtemperatur vier Stunden lang refluxiert. Anschließend wurde das Methanol abdestilliert und das Hydrolysat zur Kristallisation in den Kühlschrank gestellt. Nach 24 Stunden wurde abgenutscht, aus 30 proz. Methanol zwei mal umkristallisiert, in der Trockenpistole bei 120° über Phosphorpentoxid getrocknet und dann gewogen.

Papierchromatographischer Nachweis der Zucker

Die salzsaure Hydrolysenflüssigkeit wurde mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde zweimal mit je 1 ml Pyridin extrahiert. Die im Pyridin gelösten Zucker wurden abwechselnd mit verschiedenen Testzuckern im Abstand von 3 cm auf Papier aufgetragen und absteigend chromatographiert.

Fließmittel: a) n-Butanol-Eisessig-Wasser (4/1/5;v/v/v)
b) Picolin-Ammoniak-Wasser (70/2/28;v/v/v)
c) Pyridin-Butanol-Wasser (1/2/1,5;v/v/v)

Nach Abdunsten des Lösungsmittels wurden die Laufbahnen mit Anilinphthalat[1] besprüht und die Chromatogramme auf 105° erwärmt. Es entstanden braune Flecke.

authentische Glucose	0,17	0,69	0,43
authentische Rhamnose	0,41	0,76	0,31
Zucker aus Glykosid D	0,17	0,69	0,43
	0,41	0,76	0,31

Die Rf-Werte und die Farbqualität der Flecke der Glykosidzucker stimmten mit den authentischen Proben überein.

Die Hydrolyse des Glykosids E wurde in derselben Weise wie bei Substanz D ausgeführt. Der Zuckeranteil wurde pc untersucht und durch Mitlaufenlassen verschiedener Zucker als Glucose identifiziert. Als Sprühmittel wurde

Benzidin-Trichloressigsäure-Äthanol (0,5/1,5/98;g/g/g)

verwendet.

Zucker E Rf = 0,19 braun und unter UV gelbe Fluoreszenz
Glucose Rf = 0,19 braun und unter UV gelbe Fluoreszenz

1) S.M. Partridge, Nature (London) 164, 443 (1949)

Gaschromatographie der Zucker

Bereitung der Säule

Eine rostfreie Stahlsäule von 5 mm innerem Durchmesser und 180 cm Länge wurde mit Äthanol gereinigt und mit Äther getrocknet. Als Trägermaterial diente mit Säure gewaschenes silanisiertes Chromosorb W.[1)x]

8,8 g Trägermasse wurden in einen Literkolben gefüllt und mit Methylenchlorid, das über Calciumchlorid getrocknet worden war, gerade bedeckt. In einem Erlenmeyerkolben wurden 3 % von 8,8 g = 281 mg SE 52[xx] in 300 ml Methylenchlorid gelöst. Diese Lösung wurde vorsichtig über die mit Methylenchlorid bedeckte Trägermasse gegossen und vorsichtig umgeschüttelt. Dann wurde das Methylenchlorid bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur am rotierenden Verdampfer abgedampft.
Bei diesem Prozeß mußte darauf geachtet werden, daß nicht durch zu schnelles Drehen des Kolbens ein zu feines Pulver entstand. Nach Wegdampfen des Lösungsmittels wurde unter gelegentlichem Drehen noch weiter evakuiert.
Das untere Ende der gereinigten Säule wurde zwei bis drei Querfinger hoch mit Glaswolle verschlossen, das Säulenmaterial eingefüllt, die Säule gebogen und über Nacht bei 200° in einem F & M-Gerät ausgeheizt.

---

1) J. Kagan, T.I. Mabry, Analytic.Chem. 37, 289 (1965)

x Chromosorb W (weiß) ist mit Calciumcarbonat gesintertes Schamotte

xx SE 52 ist ein Silikonelastomer, bestehend aus Methyl-phenyl-polysilikon mit einem maximalen Gehalt von 5 % Phenyl.

Hydrolyse

Glykosid D wurde mit 2proz. Schwefelsäure drei Stunden auf dem Ölbad bei 140° hydrolysiert und das Aglykon abgenutscht. Zur Neutralisation der sauren Lösung wurde ein Anionenaustauscher Dowex II mit einer Austauscherkapazität von 5 mval/g verwendet. Reinigung der Handelsware und Regeneration mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung in 70proz. Äthanol erfolgte in der üblichen Weise.
Das in Wasser gequollene Harz wurde in eine bürettenähnliche Röhre eingefüllt. Die schwefelsaure Zuckerlösung wurde durch die Säule geschickt. Tropfgeschwindigkeit 30/Min. Der Ionenaustauscher wurde mit Wasser nachgewaschen. Die vereinigten Eluate wurden vorsichtig am rotierenden Verdampfer eingedampft, mit wenig Wasser aufgenommen, abfiltriert und dann mit der Vakuumpumpe restlos vom Wasser befreit.

Trimethylsilylierung[1,2)]

Zur Herstellung des Trimethylchlorsilyläthers des Glykosidzuckers stand Trimethylchlorsilan zur Verfügung. Es war also nach Sweeley[3)] mit einer 50 proz. Umsetzung zu rechnen. 11 mg Zuckergemisch D wurden in 3,7 ml trockenem Pyridin (über KOH) gelöst und mit 0,15 ml Trimethylchlorsilan in einem Schnappdeckelgläschen angesetzt. Diese Mischung wurde 30 Sek. lang kräftig geschüttelt und 5 Min. stehengelassen. Nach Zugabe des Trimethylchlorsilans entstand in der Lösung eine Trübung, wahrscheinlich veranlaßt durch Pyridiniumchlorid. Nach Abfiltrieren wurden 1-5 nl in der oben beschriebenen Säule gaschromatographiert.

---

1) J. Kagan, T.I. Mabry, Analytic.Chem. 37, 289 (1965)
2) C.C. Sweeley, R. Bentley, R. Makita und W.W. Wells, J.Amer.chem. Soc. 85, 2497 (1963)

Bedingungen bei der Gaschromatographie: Temperatur: 180° isotherm, Empfindlichkeit: 2×10^{-3}, Trägergas: Stickstoff bei 4,2 Atm., Fließgeschw. des N_2: 2,2, Sauerstoffdruck: 1,5 Atm., Wasserstoffdruck: 1,2 Atm.

Zu Beginn der Versuche streuten die Retentionszeiten manchmal, sie blieben aber bei längerem Gebrauch des Gerätes konstant. Zur Sicherung der Identifizierung wurden als Vergleichssubstanz je eine Lösung von Rhamnose und Glucose und eine Mischung beider mit dem Zuckergemisch D gespritzt.

Retentionszeiten

Glucose	403 Sekunden
Rhamnose	144 Sekunden
Zucker D	403 und 144 Sekunden.

Aglykon D

Molekulargewicht des Aglykons D

Das Molekulargewicht wurde massenspektroskopisch bei 70 eV Elektronenenergie und 8 KV Beschleunigungspannung zu 316 bestimmt.

Kristallwassergehalt des Aglykons D

0,276 g Substanz verloren in 6 Stdn. bei 120° 0,014 g als Monohydrat ber. 5,39 % Wasser Gef.: 5,22 % Wasser.

Elementaranalyse und Methoxylgruppenbestimmung von Aglykon D

$C_{16}H_{12}O_7 \cdot H_2O$ (334,3)	Ber.	C 57,49	H 4,22	O 38,29	OCH_3 9,02 %
	Gef.	C 57,60	H 4,17		OCH_3 8,18 %

Alkaliabbau[1)]

10 mg Aglykon D wurden mit 1 g festem Kaliumhydroxid im Porzellantiegel geschmolzen und die Schmelze 2 1/2 Min. lang flüssig gehalten. Nach dem Erkalten der Schmelze wurde in 5 ml Wasser gelöst und mit verd. Salzsäure angesäuert. Die Lösung wurde mit Äther extrahiert, die Ätherphase mit einer 5 proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und dieser Auszug nach Wiederansäuern mit Schwefelsäure mit Äther extrahiert. Der Äther wurde mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand war feucht und konnte nicht ganz trocken erhalten werden. Der Versuch wurde unter milderen Bedingungen folgendermaßen wiederholt:

1) L. Hörhammer, H. Wagner und H.S. Dhingra, Arch.Pharmaz. 292/64 83 (1959)

Alkaliabbau nach Lindstedt[1)]

20 mg Aglykon D wurden mit 5 ml 50 proz. Kaliumhydroxidlösung 10 Min. gekocht. Nach Erkalten wurde mit verd. Salzsäure angesäuert und mit insgesamt 20 ml Äther ausgeschüttelt. Der Äther wurde abdestilliert und der Rückstand mit 1 ml Äthanol aufgenommen. Diese Lösung wurde pc untersucht: Ein Tropfen der alkoholischen Lösung der Spaltprodukte wurde auf Papier aufgetragen und mit Partridge-Gemisch entwickelt.

Das Sprühreagens wurde folgendermaßen hergestellt:
0,5 g Benzidin wurden mit 1,4 ml konz. Salzsäure verrührt und diese Suspension in 98 ml Wasser gelöst. Eine ausreichende Menge dieser Lösung wurde mit dem gleichen Volumen 10 proz. Natriumnitritlösung gemischt und solange gerührt, bis sie klar und nur schwach gefärbt war. Das Sprühreagens wurde sofort verwendet.

Methylierung des Aglykons D mit Diazomethan

Diazomethan wurde nach Gattermann-Wieland hergestellt.[2)] 40,8 mg Aglykon D wurden in 50 ml eines Äther-Methanol-Gemisches (9+1) gelöst und die ätherische Diazomethanlösung solange anteilweise hinzugegeben, bis sie nicht mehr entfärbt wurde. Zur Entfernung des überschüssigen Diazomethans ließ man den Äther im Abzug restlos abdunsten.
Der Rückstand wurde in 15 ml heißem Methanol gelöst und zum Kristallisieren in den Kühlschrank gestellt. Die weißen, büschelförmigen Kristalle wurden abgesaugt, bei 120° in der Trockenpistole getrocknet und gewogen. Ausbeute 18 mg. Schmp. 180-181°. Löslichkeit: leicht löslich in Methanol und Chloroform.

---

1) G. Lindstedt und A. Misiorny, Acta Chem.Scand. 5, 1 (1951)
2) Gattermann-Wieland, Die Praxis des organischen Chemikers, Walter de Gruyter u. Co. Verlag, Berlin 1962 (S.235)

Elementaranalyse des methylierten Aglykons D

$C_{19}H_{18}O_7$ (358)	Ber..	C 63,68	H 5,03	O 31,29	OCH_3 34,66 %
	Gef.	C 63,82	H 5,24		OCH_3 31,53 %

UV-Spektroskopie

1,4 mg Aglykon D wurden in 100 ml Methanol p.a. gelöst.[1)]

Außerdem wurden in je 100 ml Methanol p.a. einzeln gelöst:

2,5 g wasserfreies Natriumacetat

2,5 g Borsäure

2,5 g Aluminiumchlorid, wasserfrei

Zu je 2 ml Aglykonlösung wurden hinzugegeben:

1.) 1 ml Natriumacetatlösung

2.) 2 ml Borsäurelösung

3.) 2 ml Aluminiumchloridlösung

4.) 1 ml Natriumacetatlösung und
2 ml Borsäurelösung

Diese Mischungen wurden je auf 10 ml mit Methanol p.a. aufgefüllt. Die Messungen erfolgten mit der unbehandelten Substanz sofort, die mit Zugabe der Lösungen 1, 2 bzw. 3 nach 10 Min. und die nach Zugabe von Lösung 4 nach 20 Min.

1) R. Hänsel und H. Rimpler, Arch.Pharmaz. 296/9, 598 (1963)

Silylierung des Aglykons D

Aglykon D mußte zur Aufnahme des NMR-Spektrums in den besser löslichen Trimethylsilyläther übergeführt werden. Dazu wurden[1] in Stickstoffatmosphäre 3 ml Hexamethyldisilazan zu einer Lösung von 100 ml Aglykon D in 2 ml wasserfreiem Pyridin gegeben. Diese Lösung wurde auf dem Ölbad 2 Stunden bei 80° gehalten. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur vertrieb man das Lösungsmittel und das überschüssige Hexamethyldisilazan bei Raumtemperatur im Hochvakuum. Um letzte Reste des Pyridins zu entfernen, wurde das Produkt in 1 ml wasserfreiem Tetrachlorkohlenstoff gelöst und wieder im Hochvakuum getrocknet. Dies wurde zweimal wiederholt. Der trockene Rückstand konnte direkt zur Aufnahme des Spektrums verwendet werden.

1) A.C. Waiss, R.E. Lundin und D.J. Stern, Tetrahedron Letter (London) 515 (1964)

Lebenslauf

Am 13. April 1928 wurde ich, Hermann Sprißler, als Sohn des AOK-Angestellten Wilhelm Sprißler und seiner Ehefrau Barbara geb. Pioth in Sigmaringen geboren.

Von 1935 bis 1943 besuchte ich die Grundschule in Sigmaringen und anschließend bis Frühjahr 1944 die Höhere Handelsschule in Ebingen. Von April 1944 bis März 1945 war ich Büroangestellter an der Deutschen Botschaft bei der Vichy-Regierung.

Danach begann ich eine Tätigkeit als Laborant in der Hofapotheke in Sigmaringen. Ab September 1949 war ich zunächst Gasthörer und ein Jahr später ordentlicher Schüler am Goldberg-Gymnasium in Böblingen, wo ich im März 1953 die Reifeprüfung ablegte. Im September 1954 begann meine Praktikantenzeit in der Apotheke am Goetheplatz in Ravensburg, die ich mit dem pharmazeutischen Vorexamen vor dem Prüfungsausschuß in Stuttgart im September 1956 abschloß.

Im Wintersemester 1957 immatrikulierte ich mich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen und legte dort 1961 das Pharmazeutische Staatsexamen ab. Meine Kandidatenzeit erfüllte ich in der Apotheke Vetter in Ravensburg, wo ich nach erhaltener Approbation 1962 noch ein weiteres Jahr tätig blieb. Im November 1963 begann ich mit der Abfassung einer Dissertation am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Graf.

Vom 1. Mai 1964 bis 1. Mai 1967 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft und seit Mai 1967 als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle an diesem Institut tätig.

Am 31. Juli 1967 heiratete ich Fräulein Apothekerin Ursula Fuchs.

Meine akademischen Lehrer waren außer Herrn Prof. Dr. E. Graf die Herren Professoren und Dozenten: H. Auterhoff, K.G. Bergner, C.H. Brieskorn, W. Hückel, H. Kaiser (Pharmazie); R.E. Bader (Hygiene); E. Bünning, A. Grahle, K. Hummel, K. Mägdefrau, H. Metzner, W. Zimmermann (Botanik und Pharmakognosie); M. Hanack, E. Müller, W. Rü-

dorff (Chemie); K. Frimmer, F. Lembeck, P. Pulewka (Pharmakologie und Toxikologie); H. Krüger (Physik); G. Weitzel (Physiologische Chemie); F.P. Möhres, J. Schwartzkopff (Zoologie).